

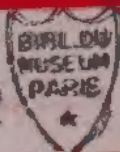
# CRYPTOGAMIE

## MYCOLOGIE

TOME 13 Fascicule 1 1992

P. 6103<sup>B</sup>

23 AVR. 1992



# CRYPTOGAMIE

## Mycologie

ANCIENNE REVUE DE MYCOLOGIE  
Fondée par R. Heim en 1936

Directeur scientifique: Mme J. Nicot  
Secrétaire de Rédaction: Mme M.C. Boisselier  
Editeur: A.D.A.C. - 12 rue Buffon F-75005 Paris.

### BUREAU DE RÉDACTION

**Ecologie et Phytopathologie:** G. Durrieu (Laboratoire Botanique et Forestier, 39 Allées Jules Guesde, F-31062 Toulouse Cedex) - **Systématique:** P. Joly (Laboratoire de Cryptogamie, Muséum National d'Histoire Naturelle, 12 rue Buffon, F-75005 Paris) - **Physiologie:** G. Manachère (Laboratoire de Mycologie, Université de Lyon I, 43 bd du 11 Novembre 1918, F-69622 Villeurbanne Cedex) - **Cytologie:** D. Zickler (Laboratoire de Génétique, Université Paris Sud, Centre d'Orsay, Bât. 400, F-91405 Orsay) - **Autres spécialités:** M.F. Roquebert (Laboratoire de Cryptogamie, Muséum National d'Histoire Naturelle, 12 rue Buffon, F-75005 Paris).

### COMITÉ DE LECTURE

J. Boidin (Lyon), J. Chevaugnon (Orsay), J. Fayret (Toulouse), W. Gams (Baarn), G.L. Hennebert (Louvain-la-Neuve), Ch. Montant (Toulouse), Cl. Moreau (Brest), D.N. Pegler (Kew), B. Sutton (Kew), G. Turian (Genève).

### MANUSCRITS

Les manuscrits doivent être adressés directement à un membre du Bureau de Rédaction, choisi pour sa spécialité. Le Bureau peut demander l'avis d'un lecteur, même s'il n'appartient pas au Comité de Lecture. Bien qu'étant une revue de langue française, les articles rédigés en anglais, allemand, italien et espagnol sont acceptés. Les disquettes de micro-ordinateur (IBM, IBM compatible, et MacIntosh) sont vivement souhaitées. Les recommandations aux auteurs sont publiées dans le fascicule 1 de chaque tome. Les auteurs recevront 25 tirés-à-part gratuits; les exemplaires supplémentaires seront à leur charge.

### TARIFS DES ABONNEMENTS Tome 13, 1992

CRYPTOGAMIE comprend trois sections: Algologie, Bryologie-Lichénologie, Mycologie.

Pour une section: France: (326 F ht) 332,85 F ttc - Étranger: 357,00 F

Pour les 3 sections: France: (918 F ht) 937,28 F ttc - Étranger: 1000,00 F

Paiement par chèque bancaire ou postal à l'ordre de:

A.D.A.C. - CRYPTOLOGIE (CCP La Source 34 764 05 \$),

adressé à: A.D.A.C. 12, rue Buffon, F-75005 Paris.

CRYPTOGAMIE, Mycologie est indexé par *Biological Abstracts*, *Current Contents*,  
*Current Awareness in Biological Sciences*,  
Publications bibliographiques du CNRS (Pascal).

26103B

# CRYPTOGAMIE

## MYCOLOGIE

TOME 13 FASCICULE 1 1992



### CONTENTS

F. HINZELIN, F.H. JACOB, J. PERRIER et M.C. VERNER - Yeast microflora evolution during anaerobic digestion and composting of urban wastes. (In French) .....	1
L. BETTUCCI and S. SILVA - Interspecific interactions between wood-rotting fungi from old standing trees .....	11
Z. FORTAS et G. CHEVALIER - Characteristics of ascospores germination of <i>Terfezia arenaria</i> (Moris) Trappe originating from Algeria (In French) .....	21
A.I.I. ABDEL-HAFEZ and O.M.O. EL-MAGHRABY - Fungal flora and aflatoxin associated with cocoa, roasted coffee and tea powders in Egypt .....	31
G. DIAZ, A. ROLDAN y J. ALBALADEJO - Soil type as affecting colonization patterns and mycorrhizal symbiosis effectiveness of six <i>Glomus</i> species. (In Spanish) .....	47
L. ZUCCONI - Mycological exsiccata from Borneo, collected by Odoardo Beccari, kept in the Herbarium Cesatianum (RO) .....	57
C.V. SUBRAMANIAN - <i>Tretocephala decidua</i> gen. et sp. nov., an interesting new Hyphomycete .....	65
Bibliography .....	69
Instructions to authors .....	78

Bibliothèque Centrale Muséum



3 3001 0022847 1

Source : MNHN, Paris

# MEMORANDUM

TO : [Illegible]

FROM : [Illegible]

SUBJECT : [Illegible]

[Illegible text]

## ÉVOLUTION DE LA FLORE LEVURIENNE AU COURS DU TRAITEMENT DES ORDURES MÉNAGÈRES

F. HINZELIN\*, F.H. JACOB, J. PERRIER et M.C. VERNER\*\*

\* Laboratoire de Cryptogamie, UFR Sciences Pharmaceutiques et Biologiques, B.P. 403 - 5, rue Albert Lebrun, 54001 - Nancy Cedex - France.

\*\* Laboratoire de Microbiologie Physiologique et appliquée, Université de Lyon I, 43 Bd du 11 Novembre 1918, 69622 - Villeurbanne Cedex - France.

**RÉSUMÉ** - La population de levures au cours du traitement des ordures ménagères a été étudiée. 44 espèces ont été isolées et identifiées. Les plus fréquemment rencontrées sont *Candida famata*, *Candida lambica*, *Rhodotorula rubra* et *Candida haemulonii*. Les ordures ménagères contiennent un grand nombre de levures mais ce nombre diminue considérablement après la digestion en anaérobiose et après divers autres traitements. Le compost de 8 semaines présente encore une population levurienne importante et les espèces les plus fréquentes de levures des ordures ménagères y sont retrouvées.

**ABSTRACT** - Yeast population of urban wastes and products of their anaerobic treatment have been examined. 44 species have been isolated and identified. The most frequently found were *Candida famata*, *Candida lambica*, *Rhodotorula rubra* and *Candida haemulonii*. Urban wastes contain a great number of yeasts but a few number remain after methanization and after other stages of the treatment process. In a eight-week-old compost there is also an important yeast population and the most frequent yeasts of urban wastes were also found here.

**MOTS CLÉS** : digestion anaérobie, compost, ordures ménagères, levures.

### INTRODUCTION

De nos jours l'accumulation des ordures ménagères pose un problème difficile à résoudre (Dorfmann & Batsch, 1985). Parmi les solutions possibles non seulement la digestion anaérobie entraîne une bonne dépollution organique, mais permet aussi d'obtenir une production énergétique sous forme de biogaz contenant environ 60% de méthane et un engrais organique très utile en agriculture.

Les ordures ménagères contiennent une population microbienne très importante tant au plan quantitatif que qualitatif, avec une forte fraction fongique, en particulier levurienne. Il est intéressant de quantifier et d'identifier les différentes composantes de cette zymoflore et de suivre son évolution durant les étapes successives du traitement des ordures ménagères (Jacob et al., 1986).

Ce travail consiste donc à identifier et quantifier les levures isolées à partir d'échantillons d'ordures ménagères et des produits issus des différentes étapes de la digestion anaérobie. Comparativement les tests sont également faits sur du

compost âgé de 8 semaines, produit à partir des ordures ménagères triées analogues à celles introduites dans le digesteur. Il s'agit dans ce cas d'un traitement aérobique (Segura, 1984). Les échantillons provenant de l'Unité de méthanisation de Valorga Process (La Buisse, 38, France) sont prélevés et analysés pendant une période de six mois.

## MATÉRIELS ET MÉTHODES

### 1 - Unité de procédé de méthanisation

Il apparaît nécessaire de décrire brièvement le procédé du traitement (Perrier et al., 1988) (Fig. 1 et 2).

Les ordures sont mélangées continuellement avec du jus pressé afin d'obtenir le digestat (30% matière sèche) utilisé pour obtenir une fermentation anaérobie optimale.

Le temps de séjour du digestat en condition mésophile (37°C) dans le réacteur est de 21 jours. Le mélange est assuré par une réinjection sous pression du biogaz produit qui en favorise l'homogénéisation.

Après digestion, les boues sont retirées du fermenteur et pressées pour obtenir "un gâteau" (pressat) contenant environ 60% de matière sèche. Le jus issu du pressage est recyclé dans le mélangeur. Le pressat est ensuite émotté

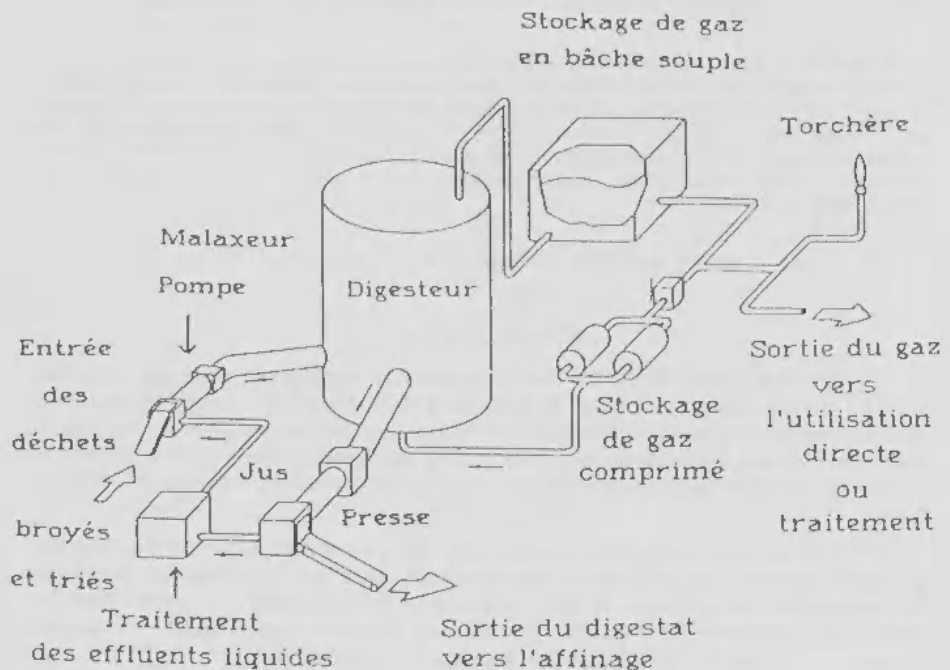


Figure 1: schéma de l'unité de méthanisation du procédé Valorga.

Figure 1: scheme of methanization unit Valorga process.

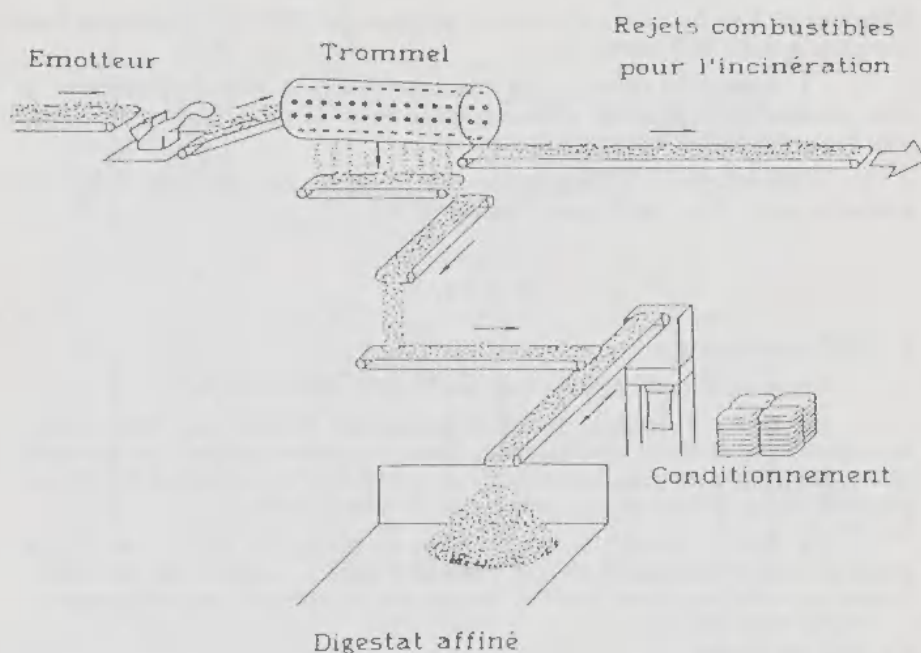


Figure 2: schéma du procédé d'affinage et de conditionnement du digestat affiné.

Figure 2: scheme of the storage and processing of refused digestate.

pour favoriser les opérations ultérieures d'affinage. Le biogaz produit est dirigé vers un gazomètre souple pour être ensuite distribué dans les réseaux d'alimentation.

## 2 - Echantillonnage

L'hétérogénéité des produits à analyser nécessite un échantillonnage méthodique. Les échantillons d'ordures ménagères, de compost et de digestat affiné sont prélevés selon la méthodologie préconisée par l'ANRED. Le digestat est prélevé en cours de recyclage lors de l'alimentation du digesteur, tandis que les prélèvements de jus et de pressat sont effectués en sortie de presse.

Les échantillons sont placés dans des récipients stériles, transportés en glacière et traités dès leur arrivée au laboratoire.

## 3 - Techniques

L'isolement des levures est effectué selon le protocole décrit ci-après et selon les techniques classiques de Kreger Van Rij (1984).

- **Numération:** 10g de chaque échantillon frais sont mélangés à 100ml d'une solution aqueuse de pyrophosphate de sodium à 0,1%. Après 15 minutes d'agitation, des suspensions-dilution successives au 1/10ème sont effectuées. Puis 0,1ml de chaque dilution est déposé aseptiquement sur trois boîtes de Pétri contenant un milieu nutritif (extrait de malt 15g/l, glucose 20g/l, gélose 15g/l, pH 4,5) additionné de chloramphénicol (40mg/l) pour inhiber la croissance

bactérienne. Les boîtes sont incubées à l'étuve à 25°C. Les colonies sont comptées après 3 et 7 jours.

- **Isolement:** les colonies sont examinées macro et microscopiquement, et trois colonies de chacun des différents types observés sur les boîtes de culture sont repiquées sur un milieu d'entretien.

- **Identification:** l'identification des espèces est effectuée selon les méthodes préconisées par Kreger Van Rij (1984).

## RÉSULTATS

### 1 - Etude quantitative

Les analyses ont été faites entre juillet 1985 et mars 1986.

La figure 3 indique le nombre total de levures dans les ordures ménagères. Les résultats sont exprimés par g de matière fraîche. Les quantités de matière sèche sont respectivement pour: juillet 45,7%, septembre 47,3%, octobre 47,5%, novembre 46,6%, janvier 53,7% et mars 52%.

La figure 4 montre le minimum et maximum de cellules de levures trouvées dans le digestat, le pressat, l'affinat et dans le compost âgé de huit semaines au cours des 6 mois pendant lesquels ont été effectués les prélèvements.

### 2 - Etude qualitative

Les ordures ménagères sont riches en levures qui appartiennent aux 44 espèces identifiées dont voici la répartition systématique:

#### 2.1 ASCOMYCOTINA

##### HÉMIASCOMYCÈTES

##### ENDOMYCÉTALES

##### SACCHAROMYCÉTACÉES

##### SACCHAROMYCÉTOIDÉES

*Pichia membranaefaciens*

*Saccharomyces cerevisiae*

#### 2.2 DEUTEROMYCOTINA

##### A - BLASTOMYCÈTES

##### CRYPTOCOCCACÉES

##### 1 - Genre *Brettanomyces*

*Brettanomyces custersianus* Van der Walt (1961)

##### 2 - Genre *Candida*

*Candida azyma* (Van der Walt, Johannsen et Yarrow) Meyer et Yarrow  
(Van der Walt et al., 1978)

*Candida catenulata* Diddens et Lodder (1942)

*Candida curvata* (Diddens et Lodder) Lodder et Kreger Van Rij (1952)

*Candida diddensiae* (Phaff, Mrak et Williams) Fell et Meyer (1967)

*Candida domercqii* (Van der Walt et Van Kerken) Meyer et Yarrow



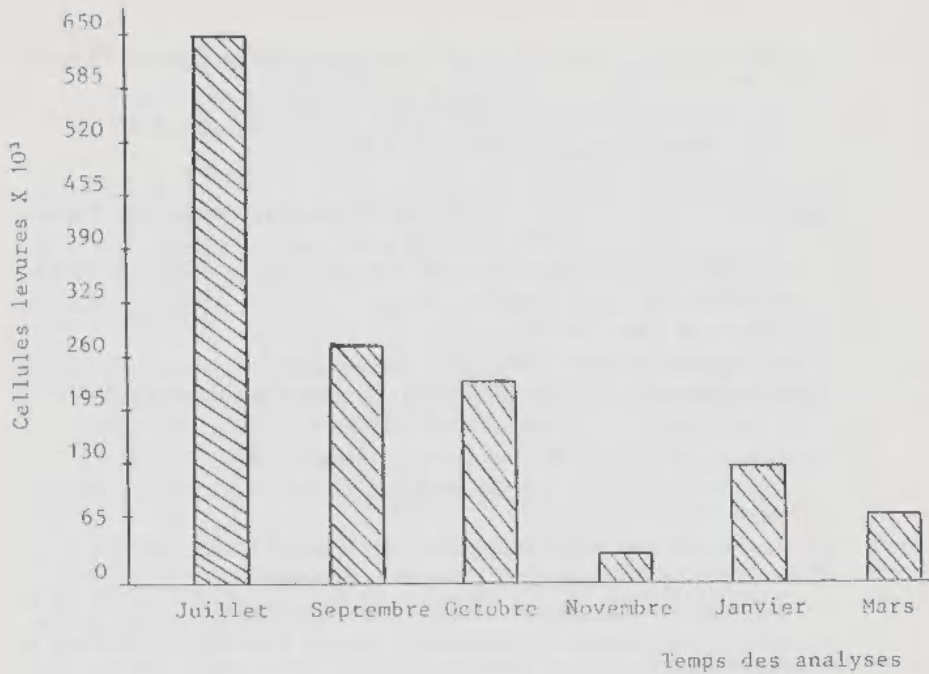


Figure 3: évolution de la quantité totale de levures des ordures ménagères en fonction des dates de prélèvements (nombre de cellules par g de poids frais).

Figure 3: evolution of the quantity of yeasts in urban wastes (number of cells per g of fresh weight).

	NOMBRE DE LEVURES /g.
Ordures ménagères	35000 → 650000
Digestat	200 → 7600
Pressat	150 → 1000
Affinat	0 → 100
Compost âgé de 8 semaines	10000 → 50000

Figure 4: minimum et maximum de cellules levures trouvées dans les différents substrats analysés.

Figure 4: minimum and maximum of yeasts cells found in the different analyzed substrats.

- Candida ernobii* (Lodder et Kreger Van Rij) Meyer et Yarrow (Yarrow et Meyer, 1978)
- Candida famata* (Harrison) Meyer et Yarrow (Yarrow et Meyer, 1978)
- Candida fermenticarella* Van der Walt et Baker
- Candida globosa* Yarrow et Meyer
- Candida haemulonii* (Van Uden et Kolipinski) Meyer et Yarrow (Yarrow et Meyer, 1978)
- Candida holmii* (Jorgensen) Meyer et Yarrow (Yarrow et Meyer, 1978)
- Candida inconspicua* (Lodder et Kreger Van Rij) Meyer et Yarrow (Yarrow et Meyer, 1978)
- Candida ingens* Van der Walt et Van Kerden (1961 c)
- Candida intermedia* (Ciferri et Ashford) Langeron et Guerra (1938)
- Candida ishiwadae* Sugiyama et Goto (1969)
- Candida kefyr* (Beijerinck) Van Uden et Buckley (1970)
- Candida krusei* (Kockova-Kratochvilova) Meyer et Yarrow (Yarrow et Meyer, 1978)
- Candida lambica* (Linder et Genoud) Van Uden et Buckley (1970)
- Candida lipolytica* (Harrison) Diddens et Lodder
- Candida maltosa* Komagata, Nakase et Katsuya (1964)
- Candida membranaefaciens* (Lodder et Kreger Van Rij) Wickerham et Burton (1954)
- Candida mogii* Vidal-Leiria (1967)
- Candida parapsilosis* (Ashford) Langeron et Talice (1932)
- Candida pintolopesii* (Van Uden) Meyer et Yarrow (Yarrow et Meyer, 1978)
- Candida rhagii* (Diddens et Lodder) Jurzitza, Kuhlwein et Kreger Van Rij (1960)
- Candida rugosa* (Anderson) Diddens et Lodder (1942)
- Candida sake* (Saito et Ota) Van Uden et Buckley (1970)
- Candida silvicola* Shifrine et Phaff
- Candida* sp.
- Candida tepae* Grinbergs (1967)
- Candida valida* (Leberle) Van Uden et Buckley (1970)
- Candida vini* Van Uden et Buckley (1970)
- 3 - Genre *Cryptococcus*
- Cryptococcus albidus* (Saito) Skinner (1947)
- Cryptococcus hungaricus* (Zsoft) Phaff et Fell (1970)
- Cryptococcus laurentii* (Kufferath) Skinner (1947)
- 4 - Genre *Kloeckera*
- Kloeckera apiculata* (Reess Emend. Kloecker) Janke (1928)
- 5 - Genre *Rhodotorula*
- Rhodotorula glutinis* (Fresenius) Harrison (1928)
- Rhodotorula minuta* (Saito) Harrison (1928)
- Rhodotorula rubra* (Demme) Lodder (1934)

6 - Genre *Trichosporon*

*Trichosporon cutaneum* (De Beurm, Gougerot et Vaucher) Ota (1926)

*Trichosporon* sp.

## B - HYPHOMYCÈTES

*Geotrichum*

- MICROFLORE ASSOCIÉE:

*Penicillium*

Mucorales

La figure 5 indique les espèces de levures isolées des substrats caractéristiques obtenus lors des principales étapes du traitement des ordures. Les espèces sont classées selon leur fréquence.

## DISCUSSION

On peut noter que la quantité de levures présentes dans le digestat et l'affinat est moins importante que celle observée dans les ordures ménagères (fig. 4). En effet le digestat en comporte de 200 à 7600, le pressat de 150 à 1000 et l'affinat de 0 à 100.

Ainsi observe-t-on que la quantité de levures diminue durant le traitement. Il semble probable que les conditions anaérobies de la méthanisation (21 jours de temps de rétention dans le digesteur) jouent un rôle sur cette diminution. La température de digestion (37, 38°C) peut aussi avoir une influence sur l'élimination de quelques espèces.

Dans les cas du digestat pressé et de l'affinat, le principal paramètre inhibiteur est la quantité d'eau. En effet, la matière sèche est alors comprise entre 60 et 63%, elle est seulement de 30% dans le digestat.

La quantité de levures dans le compost âgé de huit semaines est relativement stable: elle est toujours située entre 10000 et 50000 levures (par g de poids frais). La phase thermique du compostage est alors terminée: nous observons un équilibre écologique à cette étape de maturation. La présence d'une population de levures plus importante que dans le digestat peut être attribuée à l'aération et à l'acidification du milieu, consécutive aux fermentations qui président à la production du compost. Signalons toutefois que durant la phase de montée initiale de la température du compost (jusqu'à 170° pendant plusieurs dizaines d'heures), l'ensemble de la population microbienne diminue considérablement. Ensuite on observe une recolonisation progressive du milieu avec la descente en température et la maturation du compost.

Notre étude ne nous a pas permis d'avoir une analyse cinétique du phénomène puisque les échantillons examinés étaient âgés de 8 semaines.

La figure 5 montre la distribution des espèces trouvées dans les différents échantillons selon leur origine: les levures blanches particulièrement celles du genre *Candida* sont les plus fréquentes; parmi celles-ci on trouve *Candida lambica*, *C. famata*, *C. lipolytica*, *C. haemulonii*, *C. valida* et une ascosporegène *Saccharomyces cerevisiae*.

Nous trouvons seulement trois espèces colorées, la plus importante étant *Rhodotorula rubra*. Nous observons aussi la présence relativement constante de *Geotrichum* sp.

Figure 5: espèces de levures isolées des différents substrats analysés.  
 Figure 5: yeast species isolated from the different analyzed substrates.

	OM	D	P	A	A1	C
<b>LEVURES FRÉQUENTES</b>						
<i>Candida famata</i>	*	*		*	*	*
<i>Candida lambica</i>	*		*	*	*	
<i>Geotrichum</i>	*		*	*	*	
<i>Rhodotorula rubra</i>	*		*	*		*
<i>Candida haemulonii</i>	*		*	*	*	
<i>Candida lipolytica</i>	*	*				*
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	*					*
<i>Candida valida</i>	*			*	*	
<i>Candida pintolopesii</i>	*			*		
<i>Candida ingens</i>	*			*		
<i>Candida krusei</i>	*				*	
<i>Candida sake</i>				*	*	
<i>Rhodotorula minuta</i>	*					
<i>Cryptococcus hungaricus</i>	*	*				
<i>Cryptococcus laurentii</i>	*	*				
<b>AUTRES LEVURES</b>						
<i>Brettanomyces custersianus</i>	*					
<i>Candida azyma</i>						*
<i>Candida catenulata</i>	*					
<i>Candida curvata</i>						*
<i>Candida diddensiae</i>						*
<i>Candida doenerckii</i>	*					
<i>Candida ernobii</i>	*					
<i>Candida fermenticarenis</i>	*					
<i>Candida globosa</i>	*					
<i>Candida holmii</i>	*					
<i>Candida inconspicua</i>	*					
<i>Candida intermedia</i>	*					
<i>Candida ishiwadae</i>		*				
<i>Candida kefir</i>					*	
<i>Candida maltosa</i>	*					
<i>Candida membranaefaciens</i>						*
<i>Candida mogii</i>	*					
<i>Candida parapsilosis</i>	*					
<i>Candida rhagii</i>				*		
<i>Candida rugosa</i>	*					
<i>Candida salmonicola</i>				*	*	
<i>Candida silvicola</i>				*		
<i>Candida sp.</i>						*
<i>Candida tepae</i>			*			
<i>Candida vini</i>	*					
<i>Cryptococcus albidus</i>						*
<i>Kloeckera apiculata</i>	*					
<i>Pichia membranaefaciens</i>	*					
<i>Rhodotorula glutinis</i>						*

SYMBOLES: OM: ordures ménagères, D: digestat, P: digestat pressé, A: affinat (digestat affiné juste produit), A1: affinat (digestat affiné âgé d'un mois), C: compost âgé de huit semaines.

SYMBOLS: OM: Urban Wastes, D: Digestate, P: Pressed digestate, A: Affinat (Refined digestate just produced), A1: Affinat (One month-old-refined digestate), C: Eight-week-old compost.

Quelques observations sur les levures les plus fréquentes peuvent être faites:

- *Candida lambica* (= *Pichia fermentans*) est la plus fréquemment isolée. En accord avec les auteurs américains (Skinner et al., 1980) *P. fermentans* est trouvée en grande quantité sur des fruits en décomposition. Cette levure formant un film sur les tissus nécrosés est très largement utilisée en tant que nourriture d'espèces sauvages de *Drosophiles* (Rose & Harrison, 1987). Aussi *C. lambica* peut donc se trouver facilement dans les ordures ménagères et à tous les stades du procédé.

- *Candida famata* (= *Torulopsis famata*) et son télomorphe *Debaryomyces hansenii* sont les espèces les plus communes de l'écosystème marin. Les facteurs tels que son caractère homothallic, son mode de formation des ascospores, sa tolérance au sel, sa capacité d'utiliser de nombreuses sources de carbone, lui permettent certainement cette distribution ubiquiste. Cette levure est aussi xérotolérante (Rose & Harrison, 1987). Pour Skinner (Skinner et al., 1980) *D. hansenii* peut se développer lentement en absence d'oxygène. Cette possibilité explique sa présence constante dans le digestat.

- *Candida lipolytica*, *Candida haemulonii* et *Candida valida* furent souvent isolées du sol, de produits laitiers, de fruits ou de crachats humains. Bien que *Candida haemulonii* ait été isolé du biotope marin, il a été trouvé dans les ordures ménagères, le digestat pressé et l'affinat.

Cependant en considérant les espèces les plus fréquemment trouvées aussi bien dans les ordures ménagères que dans le digestat, *Candida famata* et *Candida lipolytica* sont capables de fermenter des glucides, et curieusement *Cryptococcus hungaricus* et *Cryptococcus laurentii*, levures ubiquistes, hôtes de la phyllosphère, fruits et jus de toutes sortes, ne le sont pas.

- Les seules espèces sporogènes isolées sont *Saccharomyces cerevisiae* et *Pichia membranaefaciens*.

- Dans les ordures ménagères, *Candida albicans*, indicateur de pollution humaine n'est pas détecté dans les différents échantillons bien que les ordures constituent pourtant un excellent biotope et malgré l'utilisation d'un milieu spécial tel que "Biggy-agar" (Hinzelin & Lectard, 1979) préconisé pour la détection de cette levure. Quant à *Trichosporon cutaneum*, il n'est rencontré que très sporadiquement. En effet il n'a été mis en évidence que dans deux échantillons d'ordures ménagères triées.

#### BIBLIOGRAPHIE

- DORFMANN R. and BATSCH G., 1985 - *Les résidus urbains - "Traitement et valorisation"*. 2ème éd., Vol. 2. Assoc. Gén. Hygiénistes et Techniciens Municipaux. Paris, Lavoisier Techn. et Doc.
- HINZELIN F. et LECTARD P., 1979 - Les levures dans les stations d'épuration des eaux usées. *Mycopathologia* 69: 121-127.
- JACOB J.F., PERRIER J. et DESBOIS S., 1986 - *Unité de méthanisation d'ordures ménagères de la Suisse (Société VALORGA) Bilan de fonctionnement. Rapport d'expertise AFME-ANRED*, 118 p.
- KREGGER VAN RIJ N.J.W., 1984 - *The yeast - A taxonomic study*. Third ed. Amsterdam, Elsevier Sci. Pub.

- PERRIER J., JACOB F. et DESBOIS S., 1988 - Ordures ménagères: la méthanisation atteint la maturité industrielle. *Biofutur* 74: 30-34.
- ROSE A.H. and HARRISON J.S., 1987 - *The Yeasts* - vol. 1: *Biology of Yeasts*. vol. 2: *Yeasts and Environment*. London, Academic Press.
- SEGLURA J., 1984 - Le compostage des ordures ménagères et ses débouchés agronomiques. *Biofutur* 21: 19-29.
- SKINNER F.A., PASSMORE S.M. and DAVENPORT R.P., 1980 - *Biology and activity of yeasts*. London, Academic Press.

## INTERSPECIFIC INTERACTIONS BETWEEN WOOD-ROTTING FUNGI FROM OLD STANDING TREES

L. BERTUCCI and S. SILVA

Departamento de Botánica, Facultad de Ciencias Tristán de Navaja 1674, Montevideo, Uruguay

**ABSTRACT** - Mycelial interactions between wood-rotting fungi isolated from old standing trees of peach and willow and from detached wood of willow, were studied on culture media. The outcome of all pairings between fungi from peach (*Coriolus versicolor*, *Pycnoporus sanguineus*, *Phellinus pomaceus*) were deadlock, whilst replacement of one species by the other characterized the interactions between fungi from willow (*Laetiporus sulphureus*, *Pycnoporus sanguineus*, *Panus tigrinus*, *Trametes extenuata*). During the replacement interactions the overgrowing species changed their mode of growth, whilst the replaced species exhibited morphogenetic, cytological and biochemical responses implying activation of senescent development. Pigmented zones always developed at the interface between paired cultures in deadlock and in replacement.

Diffusible metabolites produced by individual fungi and transmissible through ■ cellophane membrane had little effect on radial extension of the other fungi. However, in one case morphogenetic changes were induced which were maintained when submerged mycelium was transferred to fresh medium.

Deadlock responses between the species from peach could reflect partitioning in use of resources allowing the species to persist adjacent to one another. Conversely, the ecological strategy of fungi from willow was to take over domain where *Laetiporus sulphureus* had become established in the standing tree.

**RÉSUMÉ** - Les interactions entre mycélium de champignons causant la pourriture du bois de pêcher et de saule sur pied et de branches de saule coupées ont été étudiées en culture. Les résultats des confrontations entre champignons isolés de pêcher (*Coriolus versicolor*, *Pycnoporus sanguineus* et *Phellinus pomaceus*) montrent le blocage réciproque des colonies tandis que les champignons isolés de saule (*Laetiporus sulphureus*, *Pycnoporus sanguineus*, *Panus tigrinus* et *Trametes extenuata*) montrent le recouvrement d'une espèce par l'autre. Dans ce dernier cas, l'espèce recouvrante change de mode de croissance et l'espèce recouverte montre des transformations morphogénétiques, cytologiques et biochimiques conduisant à la sénescence. Une zone pigmentée s'observe toujours ■ l'interface entre les deux colonies.

Les métabolites diffusibles à travers la cellophane, produits par chaque espèce, ont un effet limité sur les champignons testés. Cependant, dans un cas, un changement morphogénétique est induit dans le mycélium immergé. Il se montre stable après plusieurs repiquages.

Le blocage réciproque observé entre espèces isolées du pêcher pourrait traduire le partage des ressources nutritives permettant aux espèces de coexister. Par contre, les champignons isolés de saule manifestent un envahissement du substrat après la colonisation préliminaire par *L. sulphureus*.

**KEY WORDS** : wood-rotting fungi, interspecific interactions, willow brown-rot, peach white-rot.

## INTRODUCTION

A large amount of literature (Mercer, 1982; Merrill & Shigo, 1979; Rayner *et al.*, 1987; Rayner & Coates, 1987; Shigo, 1967, 1972, 1979; Shigo & Marx, 1977) suggests that fungal decay of stem and branches of standing trees is initiated by wounds which allow access of non-decay-causing microorganisms prior to establishment of decay causing Basidiomycetes. However, it is becoming apparent that colonization in natural conditions occurs not necessarily by major wounds and when studying attached oak branches it was found that wood-rotting Basidiomycetes were primary colonizers (Boddy *et al.*, 1985, 1987; Boddy & Rayner, 1982, 1983a). Factors such as temperature, CO<sub>2</sub>, water activity, inoculum potential and interspecific interactions may all selectively influence which species of wood-rotting fungi succeed eventually in colonizing a specific resource (Boddy *et al.*, 1987; Clarke *et al.*, 1980; Rayner, 1986).

Changes in composition of a wood-rotting Basidiomycetes community may occur in relation with changes in the microenvironmental conditions which alter the competitive ability of one fungus in relation to the other. On the other hand, under the same conditions one species might shift its resource capture strategy according to the potential strategy of the other species with which it interacts (Rayner *et al.*, 1987). Mycelial senescence and changes of mode of growth of one or both of interacting fungi seems to be a common expression of mutual recognition (Rayner & Boddy, 1988).

As it seems that the interaction of wood rotting-fungi in culture media commonly reflects their ecological strategy in nature (Rayner *et al.*, 1987; Rayner & Boddy, 1988). The aim of this work was to determine how such interactions, between species colonizing old standing trees of willow and peach are correlated with observations in the distribution of their fruit-bodies. The role of diffusible metabolites during these interactions was also analysed.

## METHODS

### Sampling of fungi from natural communities

Large fruit-bodies of *Laetiporus sulphureus* (Bull.: Fr.) Murr. which had developed on the trunks of old standing willows (*Salix humboldtiana* Willd.) with large brown rotted areas were collected during several years. Some large branches (15-20cm diameter) of one tree apparently not colonized, were cut off in the autumn 1985 and staked horizontally. In some of them a few small fruit-bodies of *L. sulphureus* appeared on the proximal side of the branch, during next summer (1986). Close to the mid portion of these branches some basidiomes of *Panus tigrinus* Bull.: Fr.) Sing. developed one year later during the autumn (1987). Finally, abundant fruit-bodies of *Trametes extenuata* (Dur.: Mont.) Pat. emerged during the autumn of the following two year particularly from the cambial regions adjacent to the cut distal surfaces. On the other branches, several fruit-bodies of *T. extenuata* (in the distal part) and *P. tigrinus* (in the mid) developed initially (1987) and were superseded during the two following years by abundant fruit-bodies of *Pycnoporus sanguineus* (L. G. Meyer. Fr.) Murr.

At the same time, fruit bodies of *Phellinus pomaceus* (Pers.:S.F. Gray) Llyod, *Coriolus versicolor* (L.:Fr.) Quél. and *P. sanguineus* were collected from branches of an old peach tree (*Prunus persicae* (L.) Batsch). The fruit-bodies were mainly located on the lower side but *P. sanguineus* was more abundant on



the upper side of the branches. On the base of the trunk only *Ph. pomaceus* was present. Several isolates of each species collected from peach and willow were obtained, but only one was used to provide inocula for laboratory experiments.

#### Effect of non-volatile diffusible metabolites

In order to investigate the possible involvement of non volatile diffusible metabolites in interactions, the isolates alternatively tested as metabolite producers were: *Pycnoporus sanguineus* (MVHC 5560), *Phellinus pomaceus* (MVHC 5562), and *Coriolus versicolor* (MVHC 5561) from peach; *P. sanguineus* (MVHC 5401), *T. extenuata* (MVHC 5304), *P. tigrinus* (MVHC 5400) and *L. sulphureus* (MVHC 5067) from willow. A modified version (Bettucci *et al.*, 1988) of the technique of Dennis & Webster (1971) was used. Briefly, Petri dishes of 90mm diameter containing 18ml of 2% malt-agar were used. A sterilized cellophane membrane of the same diameter was placed upon the culture medium and a disk of a fresh culture (6mm diameter) inoculated in the center. The cellophane membrane was removed 48h later. A disk of a fresh culture from other species, isolated of the same tree, was placed in the center of the culture media. Each fungus was employed as a potential antagonist. Four replicates was performed at 24 C and pH 4 at the beginning of the experiment. The diameter of each species tested was measured daily. Four replicate of each species growing on untreated culture media (control) was also performed and the diameter measured.

Growth inhibition was calculated from the formula

$$I = \frac{B.100 - 100}{T}$$

B being the mean of the diameters of the species tested with the diffusible metabolites of a potential antagonist and T the mean of the diameters of the control colonies;

Aerial and submerged mycelia from any modified mycelial organization were transferred to fresh media.

#### Interaction of dual cultures on solid media

Experimental pairings were carried on between willow wood-rotting species on one side, and between those of peach tree on the other. Four replicates of experimental pairings were made by placing disks (6mm diameter), cut from actively growing colonies, 8cm apart on 2% malt agar and incubated at 24°C in darkness, under normal atmospheric conditions. Four replicates of each species, inoculating the disk at the center of the plate, were performed under the same conditions.

Macro and micromorphological characteristics from the interaction interfaces and within 3-10mm on either side of dual cultures were observed during 6 weeks and compared with control cultures.

## RESULTS

#### Effects of non-volatile diffusible metabolite

The percentage of growth inhibitions assumed to be induced by diffusible metabolites (Table 1) generally did not exceed 15.4% in fungi from peach and 21.4% in those from willow. Although *C. versicolor* appeared to cause

100% inhibition of *Ph. pomaceus* at 48h, 12.5% inhibition was recorded 24h later, suggesting an extended lag phase before the extension of *P. pomaceus*.

Table 1. - Growth inhibition (%) at 48h of species exposed to diffusible metabolites from other species. \* The growth inhibition of *Ph. pomaceus* decreased to 12.5% at 72h. \*\* Growth stimulated.

Table 1 - Pourcentage d'inhibition de croissance d'espèces soumises aux métabolites diffusibles (à 48 heures). \* L'inhibition de croissance de *Ph. pomaceus* passe de 100% à 12.5% après 72 heures de contact. \*\* Croissance stimulée.

Metabolite producer	Strain response			
	<i>P. sanguineus</i>	<i>C. versicolor</i>	<i>Ph. pomaceus</i>	
<i>P. sanguineus</i>	-	15.4	9.1	
<i>C. versicolor</i>	1.1	-	(100)*	
<i>Ph. pomaceus</i>	10.9	7.7	-	
	<i>L. sulphur.</i>	<i>P. tigr.</i>	<i>T. exten.</i>	<i>P. sang.</i>
<i>L. sulphureus</i>	-	0	21.4	11.8
<i>P. tigrinus</i>	**	-	7.1	11.8
<i>T. extenuata</i>	**	0	-	11.8
<i>P. sanguineus</i>	**	5.0	7.1	-

Extension of *L. sulphureus* was slightly stimulated by all three other fungi tested, conversely they were generally inhibited by *L. sulphureus*.

No marked changes in developmental characteristics of the colonies were observed except when *T. extenuata* was exposed to *P. tigrinus* metabolites. *T. extenuata* produced a sterile coralloid aggregation resembling an immature frutification in the center of the colony. Sectors of prostrate alternating with farinaceous mycelium, from the irregular edges of a clear brown, cushion-like area (Figure 1b) were also produced. Aerial mycelium of the prostrate sectors, when transferred on fresh media, reverted to a normal morphology similar to that shown in Figure 1a, while the submerged mycelium of the same sector maintained the modified pattern of development, at least after five replicates.

#### Interactions of dual cultures on solid media

The outcome of interactions were deadlock, when neither fungus was able to invade the other, or replacement of one fungus by another. Recognition between the species was characterized by several modifications of hyphal morphology including: cytoplasmic degeneration, vacuolation, wall thickening and pigmentation, sporulation, profuse branching and hyphae aggregation. Pigmentation of the agar medium within or adjacent to the interaction interface frequently occurred. These outcomes are described in Table 2 and illustrated in Figure 1 (c-d).

In all dual cultures from the peach tree the reaction was deadlock.

Table 2 - Outcome and cytological modifications of interactions between wood-rotting fungi from peach (upper) and willow (bottom). C.v.: *C. versicolor*, Ph.p.: *Ph. pomaceus*, P.s.: *P. sanguineus*, P.t.: *P. tigrinus*, T.e.: *T. extenuata*, L.s.: *L. sulphureus*.

Tableau 2 - Interaction entre les champignons isolés de pêcher (partie supérieure) et de saule (partie inférieure).

<i>C. versicolor</i> P. sanguineus Deadlock. P.s. hyphae very vacuolated and plasmolysis of cytoplasm. C.v. with dense and light brown pigmented mycelium. Dark brown to black pigmentation on the agar medium at the interface and toward C.v. inocula	<i>Ph. pomaceus</i> Deadlock. P.s. as dense mat, hyphae very vacuolated and retracted cytoplasm. Ph. p. with pigmented hyphae. Light brown pigmentation on the agar medium at the interface and dark brown to black toward Ph.p. inocula.	
<i>C. versicolor</i>	Deadlock. Ph.p. pigmented thickened wall, and profusely branched hyphae. C.v. with very active cytoplasm and sinuous hyphae. Dark brown pigmentation on the agar medium at the interface.	
<i>P. sanguineus</i> T. extenuata Slight replacement of T.e by P.s. Overgrowth of P.s. mycelium with abundant arthrospores. Submerged hyphae of T.e. with vacuolated cytoplasm. Dark brown pigmentation on the agar medium at the interface and grey-green toward T.e. inocula.	<i>P. tigrinus</i> Replacement of P.t. by T.e. Brown pigmentation on the agar medium at the interface. The mycelium of T.e. raised and does not continue overgrowth when contacting the pseudo-sclerotial plate normally produced by P.t.	<i>L. sulphureus</i> Replacement of L.s. by T.e. that forms small cords in the advancing zone. L.s. growth upward and produces abundant conidia and very vacuolated hyphae. Later it is replaced by parallel organized hyphae of T.e., originated from the submerged mycelia. Clear brown pigmentation on the agar medium under the replaced mycelium.
<i>P. sanguineus</i>	Replacement of P.t. by P.s. Brown pigmentation on the interface.	Replacement of P.s. by L.s. with abundant conidia and amber-orange drops of L.s. No pigmentation on the agar medium at the interface and very light brown toward L.s. and P.s. inocula.
<i>P. tigrinus</i>		Replacement of L.s. by P.t. L.s. with abundant chlamydospores in the aerial mycelium and vacuolated, profusely branched submerged hyphae. P.t. with several vacuolated and abundant empty aerial hyphae. Parallel organization of submerged hyphae. Clear brown pigmentation on the agar medium under the replaced area of L.s.

In deadlock outcomes, the margin of *C. versicolor* and *P. sanguineus* contained sparsely branched hyaline hyphae whilst that of *P. pomaceus* consisted of a dense zone of profusely branched hyphae. In all cases the aerial mycelium adjacent to the interaction interface was raised, pigmented and denser than the remainder of the colony and from that formed in the control within the same time.

In willow the outcome was always the replacement. The organization of the marginal mycelium was different from that of the remainder of the colony. The margin of *L. sulphureus* when overgrown by *T. extenuata* and *P. tigrinus* was like that of *C. versicolor* and *P. sanguineus* in deadlock outcomes, except that it rapidly formed conidia (in front of *T. extenuata*) and chlamydospores (in front of *P. tigrinus*). The overgrowing fungi, in turn, formed aggregates of parallel hyphae in the form of small cords which subsequently converged, developing a prosenchyma upon *L. sulphureus*. When *P. sanguineus* was replaced by

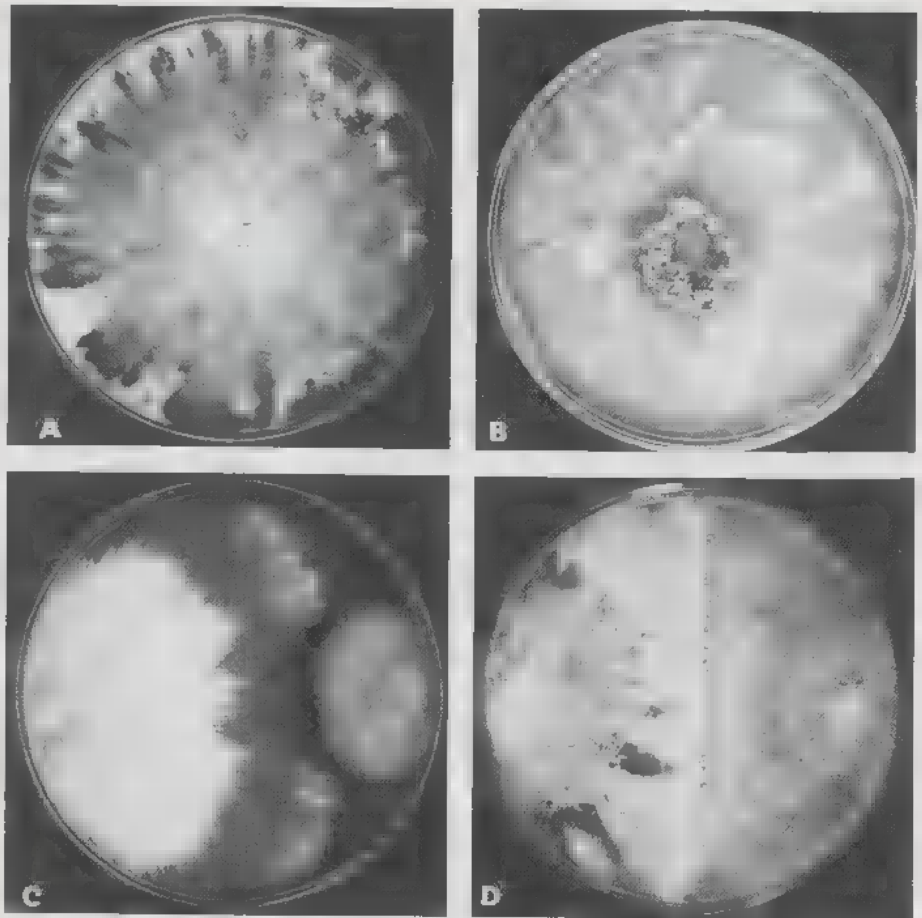


Figure 1 - Diffusible metabolites activity and outcome of interactions. Effect of diffusible metabolites of *P. tigrinus* on *T. extenuata*. (a) *T. extenuata* control. (b) *T. extenuata* treated. Morphogenetic changes induced by diffusible metabolites of *P. tigrinus*: submerged mycelium of these colonies, when transferred to fresh medium, maintained the same developmental pattern. Outcome of interactions: (c) Deadlock: *P. sanguineus* (left) and *Ph. pomaceus* (right); (d) *T. extenuata* (left) overgrowing *L. sulphureus* (right).

Figure 1 - Activité des métabolites diffusibles de *P. tigrinus* sur *T. extenuata* et interaction entre champignons. a) *T. extenuata* témoin. b) *T. extenuata* traité. Changements morphogénétiques résultant des métabolites diffusibles de *P. tigrinus* (le mycélium immergé garde le même type de développement après repiquage sur milieu frais). - Effets des interactions c) Blocage réciproque de *P. sanguineus* (à gauche) et *Ph. pomaceus* (à droite). d) Recouvrement de *L. sulphureus* par le mycélium de *T. extenuata* (à gauche).

*L. sulphureus* the margin of both mycelia were prostrated and hyaline; later both fronts coalesced and the dense, pink aerial mycelium of *P. sanguineus* behind the interface, was overgrown by *L. sulphureus*. In other cases the limit of growth was defined by dense aerial mycelium of one of the fungi, as *P. tigrinus*

or *T. extenuata* before being overgrown by *P. sanguineus*. When *T. extenuata* overgrew *P. tigrinus* dense aerial mycelium of *T. extenuata* began to form a prosenchyma replacing part of *P. tigrinus* colony. This aggregate mycelium was also formed, as described above, after transferring to fresh medium the submerged mycelium of *T. extenuata* growing in presence of diffusible metabolites of *P. tigrinus*. *T. extenuata* also formed cream-colored floccose mycelium overgrowing the remainder of the colony of *P. tigrinus* after six weeks.

## DISCUSSION

Although diffusible metabolites generally appeared to have little influence on development, the reversible modification in organization of the aerial mycelium of *T. extenuata* and the persistent changes induced in the submerged mycelium were significant. This shift in the mode of growth (Gregory, 1984) was the same as observed when *T. extenuata* was paired with *P. tigrinus*. It is possible that the metabolites responsible for these effects were of low molecular weight (as they could pass through cellophane), although in pairing experiments other molecules may be also implied (Rayner, 1986).

In replacement interactions observed between fungi of willow, overgrowing species changed their mode of growth at least three times. Probably the first trigger of change corresponded to the diffusible metabolites of *L. sulphureus*, followed by a brown pigmentation at the interface area. This pigmented zone progressively extended under the replacing mycelium. The replaced species exhibited morphogenetic, biochemical and cytological responses (as described in Table 2) implying activation of senescence mechanisms, also observed in other Basidiomycetes in presence of several different antagonist (Li, 1981; Rayner & Boddy, 1988). On the other hand, the formation of chlamydospores and conidia at the interaction interface by *L. sulphureus* (never observed in the margin of the colony of control cultures) might represent a survival mechanism before being overgrown by *P. tigrinus* or *T. extenuata*. In nature a psychogastic anamorph of *L. sulphureus* is known (Overholts, 1953).

Pigmentation of the medium was also a feature of deadlock interaction, and is a clear sign of phenoloxidase activity (Bullock, 1967; Li, 1981). Association of this activity with senescence and other developmental changes has already been proposed (Rayner & Boddy, 1988; Thompson & Rusterholz, 1982; Wessels, 1987). This might account for the growth restriction of the replaced species and the change in the mode of growth of the replacing species, as aggregate organization via products of phenoloxidase activity, may also be involved (Bullock, 1967; Miranda *et al.*, 1984; Wood, 1985).

The deadlock interactions between the species collected from peach tree might reflect partitioning in the spatial use of resources (Bradley, 1985; Moore & Hunt, 1988; Shortle & Cowling, 1978) coinciding with fruit-bodies spatial distribution.

During colonization of willow we infer that the ecological strategy of the two replacing species, *P. tigrinus* and *T. extenuata*, was to taking over domain, where *L. sulphureus* had earlier been present on the standing tree. As mycoparasitism was not observed, a non selective mechanism of antagonism could be implicated (Rayner *et al.*, 1987). In branches where *L. sulphureus* was present, *P. tigrinus* and *T. extenuata*, probably both antagonized first with *L. sulphureus*, and later between each other. In fact, after three years, *T. extenuata* dominated the court of *L. sulphureus* and of *P. tigrinus*. When *L. sulphureus* was absent *T.*

*extenuata* first superceded *P. tigrinus* but later *P. sanguineus* was the dominant population of the branches.

Although the ecological strategies of wood-rotting fungi may be modified by environmental conditions in nature (Rayner *et al.*, 1987), it may be useful to take them into account in the selection of strains for biotechnological purposes (Eriksson & Johnsrud, 1982) and for biological control purposes.

#### ACKNOWLEDGEMENTS

The authors are very grateful to Dr Rolf Singer for his critically reading of the manuscript and to SAREC for financial support.

#### BIBLIOGRAPHY

- BETTUCCI L., LUPO S. and SILVA S., 1988 - Control growth of wood-rotting fungi by non volatile metabolites from *Trichoderma* spp. and *Gliocladium virens*. *Cryptogamie, Mycol.* 9: 157-166.
- BODDY L. and RAYNER A.D.M., 1982 - Population structure inter-mycelial interactions and infection biology of *Stereum gausapatum*. *Trans. Brit. Mycol. Soc.* 78: 337-351.
- BODDY L. and RAYNER A.D.M., 1983a - Mycelial interaction, morphogenesis and ecology of *Phlebia radiata* and *Ph. rufa* from oak. *Trans. Brit. Mycol. Soc.* 80: 437-448.
- BODDY L. and RAYNER A.D.M., 1983b - Ecological roles of Basidiomycetes forming decay communities in attached oak branches. *New Phytol.* 93: 77-88.
- BODDY L. and RAYNER A.D.M., 1983c - Origins of decay in living deciduous trees: the role of moisture content and re-appraisal of the expanded concept of tree decay. *New Phytol.* 94: 623-641.
- BODDY L., GIBBON O.M. and GRUNDY M.A., 1985 - Ecology of *Daldinia concentrica* - Effect of abiotic variables on mycelia extension and interspecific interaction. *Trans. Brit. Mycol. Soc.* 85: 201-211.
- BODDY L., BARDSLEY D. and GIBBON O., 1987 - Fungal communities in attached ash branches. *New Phytol.* 107: 143-154.
- BRADLEY R.A., 1985 - Do non-random patterns of species in niche space imply competition? *Oikos* 45: 443-446.
- BULLOCK J.D., 1967 - Essays on biosynthesis and microbial development. In: SQUIBB E.R., *Lectures on Chemistry of Microbial Products*. New York, John Wiley.
- CLARKE R.W., JENNINGS D.H. and COGGINS C.R., 1980 - Growth of *Serpula lacrymans* in relation to water potential substrate. *Trans. Brit. Mycol. Soc.* 75: 271-280.
- DENNIS C. and WEBSTER J., 1971 - Antagonistic properties of species-groups of *Trichoderma*. *Trans. Brit. Mycol. Soc.* 57: 25-39.
- ERIKSSON C.K. and JOHNSRUD S.C.H., 1982 - Mineralization of carbon. In: R.G. BURNS & J.H. SLATER, *Experimental microbial Ecology*. Oxford, Blackwell Sci. Publ.: 135-153.
- GREGORY P.H., 1984 - The fungal mycelium: an historical perspective. *Trans. Brit. Mycol. Soc.* 82: 1-11.
- LY C.Y., 1981 - Phenoloxidase and peroxidase activities in zone line of *Phellinus weirii*. *Mycologia* 73: 811-821.

- MERCER P.C., 1982 - Basidiomycetes decay of standing trees. In: J.C. FRANKLAND, J.N. HEDGER & M.J. SWIFT - *Decomposer Basidiomycetes - Their Biology and Ecology*. Cambridge, Cambridge Univ. Press: 143-160.
- MERRILL W. and SHIGO A.L., 1979 - An expanded concept of tree decay. *Phytopathology* 69: 1158-1160.
- MIRANDA M., BOTTI D. and DI COIA M., 1984 - Possible genotoxicity of melanin synthesis intermediates: Tyrosinase reaction products interact with DNA *in vitro*. *Molec. Gen. Genet.* 193: 395-399.
- MOORE S.C. and HUNT H.W., 1988 - Resource compartmentalization and the stability of real ecosystems. *Nature* 333: 261-263.
- OVERTON L.O., 1953 - *The polyporaceae of the United States, Alaska and Canada*. London, Ann Arbor. Univ. Michigan State Press.
- RAYNER A.D.M., 1986 - Water and the origins of decay in trees. In: P.G. AYRES & L. BODDY, *Water, Fungi and Plants*. Cambridge, Cambridge Univ. Press. 321-341.
- RAYNER A.D.M., BODDY L. and DOWSON C.G., 1987 - Temporary parasitism of *Coriolus* spp. by *Lenzites bentlina* - A strategy for domain capture in wood decay fungus. *FEMS Microbiol. Ecol.* 45: 53-58.
- RAYNER A.D.M. and COATES D., 1987 - Regulation of mycelial organization and responses. In: A.D.M. RAYNER, C.M. BRASIER and D. MOORE, *Evolutionary biology of the fungi*. Cambridge, Cambridge Univ. Press: 115-136.
- RAYNER A.D.M. and BODDY L., 1988 - *Fungal decomposition of wood*. Chichester, John Wiley and sons.
- SHIGO A.L., 1967 - Succession of organisms in discoloration and decay of wood. *Int. Rev. Forest. Res.* 11: 237-299.
- SHIGO A.L., 1972 - Succession of microorganisms and patterns of discoloration and decay after wounding in red and white oak. *Phytopathology* 62: 256-259.
- SHIGO A.L. and MARK H.G., 1977 - Compartmentalization of decay in trees. US Department of Agriculture, Forest Service Information. Bulletin 405.
- SHIGO A.L., 1979 - Tree decay - an expanded concept. US Department of Agriculture, Forest Service Information. Bulletin 419.
- SHORT F.W.C. and COWLING E.B., 1978 - Development of discoloration, decay and microorganisms following wounding of sweetgum and yellow poplar trees. *Phytopathology* 68: 609-619.
- THOMPSON J.D. and AUSTERHOLZ K.A., 1982 - Overlap summary indices and the detection of community structure. *Ecology* 63: 274-277.
- WISSERS J.G.H., 1987 - Growth and development in a model basidiomycete: *Schizophyllum commune*. In: E. ODIER, *Lignin enzymes and microbial degradation*. Paris, INRA Publ.: 19-42.
- WOOD D.A., 1985 - Production and role of extracellular enzymes during morphogenesis of Basidiomycetes fungi. In: D. MOORE, L.A. CASSELLON, D.A. WOOD & J.C. FRANKLAND, *Developmental biology of higher fungi*. Cambridge, Cambridge Univ. Press: 375-387.





## CARACTÉRISTIQUES DE LA GERMINATION DES ASCOSPORES DE *TERFEZIA ARENARIA* (MORIS) TRAPPE, RÉCOLTÉ EN ALGÉRIE

Z. FORTAS \* et G. CHEVALIER \*\*

\* Institut des Sciences de la Nature, Université d'Oran-es-Senia, Algérie.

\*\* I.N.R.A., Station d'Agronomie et de Mycologie, 12 av. du Brézet, 63039 Clermont-Ferrand Cedex, France.

**RÉSUMÉ** - La germination des ascospores de *Terfezia arenaria* provenant d'ascocarps secs a été obtenue sur quatre milieux de culture différents. Elle est caractérisée par une phase de latence d'origine inconnue et de durée variable, par un taux de germination faible et variable également, selon le milieu de culture. Elle est précédée par le gonflement de l'ascospore, qui double presque de volume. La forme de l'ascospore n'est pas modifiée. Différentes hypothèses sur les mécanismes à l'origine de la dormance des ascospores sont émises.

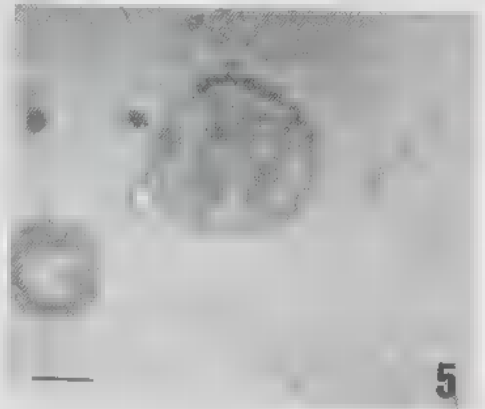
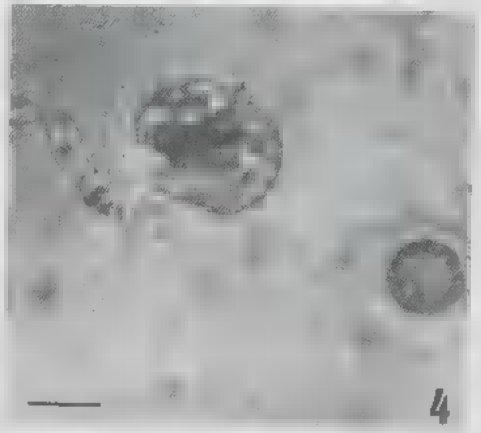
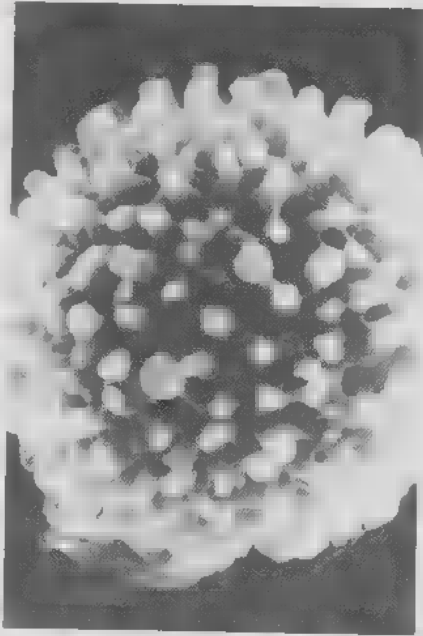
**ABSTRACT** - The germination of *Terfezia arenaria* ascospores originating from dried ascocarps was obtained on four different culture media. It was characterized by a latency period of unknown origin and variable duration and preceded by swelling of the ascospores resulting in a doubling of their volume. The ascospore shape was not modified. Various hypotheses about the mechanisms which might cause ascospore dormancy are suggested.

**MOTS CLÉS** : germination, ascospores, dormance, *Terfezia arenaria*.

### INTRODUCTION

De nombreux champignons mycorhiziens sont facilement isolés et cultivés sur milieux artificiels; par contre, les cultures de mycélium des champignons des genres *Tuber*, *Terfezia* et *Tirmania* sont plus difficiles à obtenir. On ne connaît aucun milieu véritablement favorable à la germination des ascospores de *Tuber*.

Les méthodes d'isolement et de culture des *Tuber* ont fait l'objet de nombreuses recherches. Des travaux sur la germination des ascospores de *Tuber melanosporum* ont été effectués par Melendez-Howell & Cailleux (1971), Grente & al. (1972), Rouquerol & Payré (1975a). Les différentes méthodes d'isolement du mycélium et l'obtention des cultures mycéliennes de *Tuber melanosporum* ont été rapportées par Fontana (1968, 1971), Chevalier (1972), Rouquerol & Payré (1975b). En ce qui concerne les Terfez, la germination des ascospores de quatre espèces de Terfez (*Terfezia boudieri*, *T. claveryi*, *Tirmania pinoyi* et *T. nivca*) a été obtenue pour la première fois, au Koweït, par Awameh & Alsheikh (1979a et b, 1980a et b). Les cultures obtenues à partir de ces ascospores se sont révélées mycorrhizogènes (Awameh et al., 1979).



L'objet de cette étude est de présenter les premiers résultats sur les caractéristiques de la germination des ascospores de *Terfezia arenaria* (Moris) Trappe (= *Terfezia leonis* Tul.).

### MATÉRIEL ET MÉTHODES

Les corps fructifères de *T. arenaria* ont été récoltés en avril 1986 dans les zones semi-arides d'Algérie (Zeriguët), à proximité de la plante-hôte, *Helianthemum guttatum*.

*T. arenaria* se différencie des autres espèces de Terfez par l'ornementation des ascospores qui sont sphériques, à verrues tronquées en "dents d'engrenage" (Fig. 1); elles mesurent  $20.1 \pm 0.2 \mu\text{m}$  de diamètre (Tab. 2)

Dans le cas des Terfez, il n'a jamais été possible d'isoler le champignon à partir de fragments de glebe (Fortas, 1990), comme chez les truffes (Fontana, 1968, 1971; Chevalier, 1972); l'isolement à partir de mycorhizes a été réussi par Awamch & Alsheikh (non publié), suivant la technique utilisée par Chevalier avec *Tuber melanosporum* (1972), mais il est délicat; les cultures mycéliennes ont donc été isolées à partir d'ascospores extraites d'ascocarpes desséchés au soleil, pendant deux mois, puis conservés à la température ambiante.

La méthode consiste à prélever des fragments de glebe à partir d'exsiccata d'ascocarpes dont la surface a été préalablement désinfectée à l'alcool; les fragments sont réhydratés dans de l'eau stérile, puis broyés à l'aide d'un homogénéiseur à très faible vitesse, toujours dans de l'eau stérile, de manière à obtenir une suspension d'ascospores. Une goutte de cette suspension sporale est étalée à la surface d'une boîte de Petri, sur milieu nutritif gélosé.

---

Figure 1: Ascospore de *T. arenaria* observée au microscope électronique à balayage; les verrues sont cylindriques et tronquées au sommet. Echelle:  $5 \mu\text{m}$ .

Figure 1: *Terfezia arenaria* ascospores observed by scanning electron microscopy. The spore warts are cylindrical and their tops are truncated. Scale:  $5 \mu\text{m}$ .

Figure 2: Gonflement d'une ascospore en cours de germination; remarquer la présence du globule réfringent à l'intérieur de la spore. Echelle:  $10 \mu\text{m}$ .

Figure 2: Ascospore swelling during the germination. A refringent corpuscle can be observed inside the spore. Scale:  $10 \mu\text{m}$ .

Figure 3: Détail de l'exospore rompue, avant l'extrusion du tube germinatif. Echelle:  $10 \mu\text{m}$ .

Figure 3: Detail of the broken exospore before the germ-tube shoots out. Scale:  $10 \mu\text{m}$ .

Figure 4: Tube germinatif unique émis par l'ascospore; remarquer le diamètre de la spore en germination par rapport à celui de la spore non germée. Echelle:  $20 \mu\text{m}$ .

Figure 4: Ascospore with single germ-tube. The diameter of this germinating spore appears larger than that of the non-germinating one. Scale:  $20 \mu\text{m}$ .

Figure 5: Deux tubes germinatifs émis par une ascospore; remarquer la libération des globules lipidiques et le diamètre de la spore en germination comparativement à celui de la spore non germée. Echelle:  $10 \mu\text{m}$ .

Figure 5: Ascospore producing two germ-tubes. The lipid corpuscles are released and the diameter is larger in the germinating spore in comparison with the non-germinating one. Scale:  $10 \mu\text{m}$ .

Quatre milieux nutritifs ont été testés:

- le milieu K.I.S.R., mis au point par le Kuwait Institute for Scientific Research; il est préconisé par Awameh & Alsheikh (1979a et b, 1980a et b) comme milieu d'isolement, de conservation et de multiplication pour différentes espèces de *Terfez*; sa composition chimique fait l'objet d'une protection,

- le milieu MmA (Hewitt, 1966), utilisé par Michaels (1982) pour étudier la croissance de diverses espèces de truffes et repris par Ravolanirina (1986) pour la culture de cinq espèces de *Terfez* (quatre espèces du Koweit et une espèce française),

- le milieu de la Station d'Agronomie de l'I.N.R.A. de Clermont-Ferrand (Morizet & Mingeau, 1976; Chevalier & Desmas, 1977a) modifié par addition de malt à 1%,

- le milieu Ma constitué de malt (Cristomalt) à 1%.

Ces deux derniers milieux sont couramment utilisés à l'I.N.R.A. de Clermont-Fd.

Les boîtes de Petri ont été incubées à 25°C et observées chaque jour. La germination a été suivie *in vitro*, au microscope optique, et un comptage a été effectué sur 300 ascospores jusqu'à ce que la germination ait cessé. Le taux de germination a été exprimé par le pourcentage d'ascospores germées par rapport au nombre total d'ascospores. Les mesures du diamètre des ascospores et de la section des hyphes de germination ont été analysées statistiquement par le test "t" de Student. Les valeurs ont été indiquées avec leur intervalle de confiance, pour un coefficient de sécurité de 95% .

## RÉSULTATS ET DISCUSSION

La germination des ascospores a été possible sur les quatre milieux nutritifs testés (Tab. 1). Quel que soit le milieu, les ascospores possèdent une phase de latence, dont la durée varie de 5 à 12 jours; le taux de germination est toujours faible; il varie toutefois selon le milieu de culture (Tab. 1).

La libération de petits globules lipidiques par l'ascospore, avant sa germination, peut constituer un indice de sa capacité à germer. En période de germination, les ascospores renferment un ou deux globules très réfringents et augmentent de volume (Fig. 2), leur diamètre doublant approximativement (Tab. 2); l'exospore est ensuite rompue (Fig.3) et on observe l'extrusion du tube germinatif. Les tubes germinatifs sont le plus souvent uniques (Fig. 4); on en observe rarement deux (Fig. 5). L'hyphé qui émerge du corps sporal s'allonge puis se ramifie. Les ascospores peuvent gonfler (Fig. 6) et germer même à l'intérieur de l'asque; le tube germinatif traverse alors directement la paroi de l'asque (Fig. 7).

Dans certains lots d'ascospores nous avons souvent observé la présence de quelques ascospores de couleur et diamètre différant de l'ensemble (Fig. 8 et 9). Ces ascospores de grande dimension mesurent 30,8 à 51,3µm de diamètre; leur couleur est plus foncée et leur ornementation plus dense; elles sont au nombre de un à trois par asque (Fig. 8 et 9). Ces ascospores n'ont jamais germé, quelle que soit la durée d'incubation. Ce type d'ascospores a également été observé dans des exemplaires de *T. claveryi* récoltés en Algérie.

Milieu Espèces	K.I.S.R.	HEWITT	MALT	MORIZET
<i>T. arenaria</i>	11 j. 21.1%	5 j. 14.5%	5 j. 12.5%	12 j. 17.8%
<i>T. claveryi</i>	16 j. 14.2%	7 j. 37.3%	10 j. 15.6%	7 j. 39.2%
<i>T. pinoyi</i>	15 j. 12.7%	14 j. 16.7%	15 j. 25%	15 j. 26.8%

Tableau 1: Durée moyenne de la phase de latence (en jours) et pourcentage de germination des ascospores des espèces de Terfez étudiées.

Table 1: Average length of the latency period (in days) and ascospore germination percentage for the desert truffles species studied.

Espèces	Diamètre des ascospores (en $\mu$ )	
	avant germination	en début de germination
<i>T. arenaria</i>	20,1±0,2	37,6±6,1
<i>T. claveryi</i>	23,4±0,4	39,3±0,9
<i>T. pinoyi</i>	17,3±0,2	33,3±6,2

Tableau 2: Diamètre des ascospores (en  $\mu\text{m}$ ) avant et en début de germination.

Table 2: Ascospore diameter (in  $\mu\text{m}$ ) before and at the beginning of the germination.

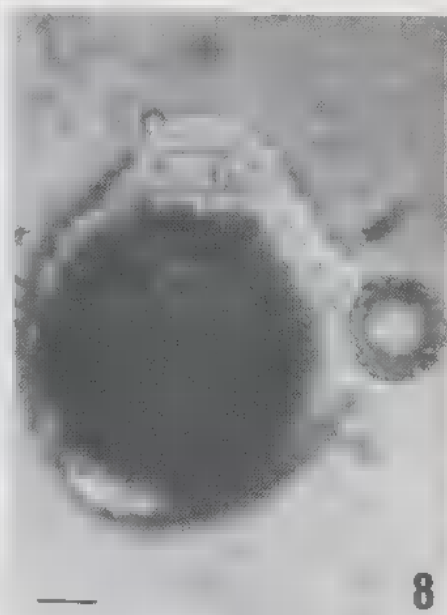
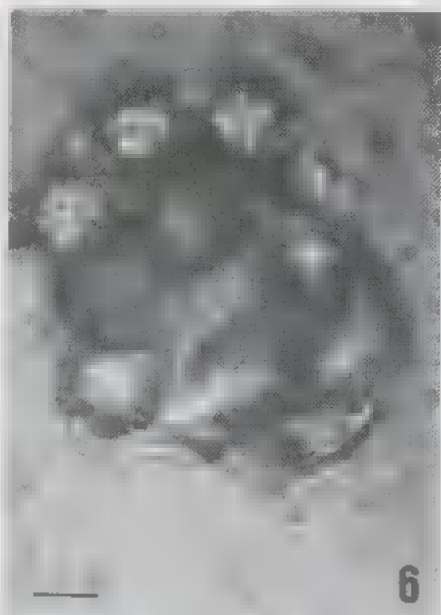
A la suite de ces observations, il a été possible de définir quelques caractéristiques importantes qui sont en accord avec celles faites par les chercheurs du K.I.S.R. sur d'autres espèces.

La germination est caractérisée par une phase de latence d'origine inconnue. Le pourcentage de germination des ascospores varie, dans une même espèce, selon les ascocarpes utilisés et le milieu de culture, d'où la difficulté de préconiser un milieu d'isolement standard pour les Terfez.

Au cours de la germination des ascospores de *T. arenaria*, le tube germinatif émerge d'un point quelconque de l'ascospore comme l'ont déjà signalé Awameh & Alsheikh (1979a et b, 1980a et b) chez les quatre espèces de Terfez du Koweït. Nous n'avons pas observé non plus de site spécifique de sortie du tube germinatif, ni l'existence d'un pore germinatif, contrairement à ce qu'ont signalé divers auteurs dans le cas des ascospores de *Tuber* (Melendez-Howell & Cailleux, 1971; Grente et al., 1972; Rouquerol & Payré, 1975b). La germination des ascospores à l'intérieur de l'asque et le passage du tube germinatif à travers la paroi ascale ont également été observés *in vitro* par Dupré & Chevalier (non publié) chez *Tuber melanosporum*, mais dans ce cas, il n'y a pas gonflement préalable de l'ascospore.

La présence d'ascospores de grande dimension chez *T. arenaria*, comme chez *T. claveryi*, est difficile à expliquer. Existe-t-il deux types d'ascospores chez ces espèces? Ces ascospores ont-elles des propriétés spéciales? Aucun résultat ne nous a permis de le confirmer étant donné la rareté de ces ascospores et leur inaptitude à germer.

Des études réalisées sur la germination des ascospores de deux autres espèces de Terfez d'Algérie, *Terfezia claveryi* et *Tirmania pinoyi* n'ont pas da-



vantage permis de connaître l'origine du faible pouvoir germinatif des ascospores de ces champignons (Tab. 1 et 2). Dans le cas de *T. melanosporum*, de nombreux facteurs susceptibles d'agir sur la germination des ascospores ont été évoqués (âge des ascospores, humidité relative, imperméabilité des enveloppes sporales) et de nombreux traitements destinés à lever la dormance des ascospores ont été tentés (chocs thermiques, attaques enzymatiques, traitements chimiques, etc...) (Grente et al., 1972; Kulifaj, 1984). Il est certain que la dessiccation du corps fructifère exerce un effet positif sur la germination des ascospores, comme dans le cas des Terfez; il en est de même de l'action des basses températures (Chevalier, non publié). L'âge des spores est également important, les spores à épispore translucide germant plus facilement que celles à épispore sombre (Chevalier & Desmas, 1977b); enfin, certains traitements chimiques peuvent provoquer l'activation des spores: à l'I.N.R.A. de Clermont-Ferrand, Dupré a obtenu la germination de spores de *T. melanosporum* à l'intérieur des asques en les traitant à l'eau oxygénée, mais elle n'a pu renouveler l'expérience.

Comme les ascospores des *Tuber*, celles des Terfez présentent donc un phénomène de dormance, mais il est moins prononcé. Il peut s'agir d'une dormance constitutive (par exemple, barrière mécanique due à l'épaisseur de la paroi sporale constituant un obstacle à la pénétration d'éléments nutritifs) et ou exogène (absence de certains facteurs de croissance dans le milieu de culture); les deux phénomènes peuvent coexister. Le faible taux de germination des ascospores de Terfez montre que les facteurs qui peuvent lever la dormance ne sont pas bien maîtrisés.

### CONCLUSION

L'étude montre que la germination des ascospores de *T. arenaria* peut être réalisée *in vitro* sur différents milieux de culture; elle est difficile, mais n'exige toutefois pas de traitements spécifiques (mécanique, thermique, chimique), contrairement à celle des ascospores de *Tuber melanosporum*, en conditions de milieu identiques. Il est probable que la dormance accentuée des ascospores est un facteur important de survie dans les conditions difficiles du désert, en été (sécheresse, température élevée); toutefois, la déshydratation des ascocarpes et

---

Figure 6: Gonflement des ascospores à l'intérieur de l'asque, au cours de la germination. Echelle: 10µm.

Figure 6: Ascospore swelling inside the ascus during the germination. Scale: 10µm.

Figure 7: Emission d'un tube germinatif par une ascospore contenue dans un asque. Echelle: 10µm.

Figure 7: Production of a germ-tube by an ascospore inside the ascus. Scale 10µm.

Figure 8: Asque contenant une seule ascospore de grande dimension; remarquer son diamètre par rapport à celui de la spore normale. Echelle: 10µm.

Figure 8: Ascus containing a single large ascospore. Its diameter is larger than that of a normal spore. Scale: 10µm.

Figure 9: Asque contenant trois ascospores de grande dimension; remarquer la densité de leur ornementation. Echelle: 10µm.

Figure 9: Ascus containing three large ascospores. The density of their ornamentation is notable. Scale: 10µm.

l'abrasion de la paroi des ascospores par le sable transporté par le vent doivent être des facteurs particulièrement favorables à la levée de dormance des ascospores de *Terfezia* qui se trouvent ainsi prêtes à germer à l'arrivée des premières pluies d'automne.

## BIBLIOGRAPHIE

- AWAMEH M.S. and ALSHEIKH A., 1979a - Laboratory and field study of four kinds of truffle (Kamah), *Terfezia* and *Tirmania* species, for cultivation. *Mushroom. Sci.* 10: 507-517.
- AWAMEH M.S. and ALSHEIKH A., 1979b - Characteristics and ascospore germination of white kamé (*Tirmania nivea* and *T. pinoyi*). *Ann. Phytopathol.* 11: 223-229.
- AWAMEH M.S., ALSHEIKH A. and GHAWAS S., 1979 - Mycorrhizal synthesis between *Helianthemum ledifolium*, *H. salicifolium* and four species of the genera *Terfezia* and *Tirmania* using ascospores and mycelial cultures obtained from ascospore germination. Proc. 4th. North Americ. Conf. on Mycorrhizae, Fort Collins, Colorado, U.S.A.
- AWAMEH M.S. and ALSHEIKH A., 1980a - Ascospore germination of black kamé (*Terfezia boudieri*). *Mycologia* 72: 50-54.
- AWAMEH M.S. and ALSHEIKH A., 1980b - Features and analysis of spore germination in brown kamé *Terfezia clavervii*. *Mycologia* 72: 494-499.
- CHEVALIER G., 1972 - Obtention de cultures pures de mycélium de truffe à partir du carpophore et des mycorhizes. *Compt. Rend. Séances Acad. Agric. France* 58: 981-989.
- CHEVALIER G. et DESMAS C., 1977a - Mycorrhization par *Tuber melanosporum* de plants de *Quercus pubescens* en milieu fortement fertilisé. *Ann. Phytopathol.* 9: 93.
- CHEVALIER G. et DESMAS C., 1977 b - Synthèse des mycorhizes de *Tuber melanosporum* avec *Corylus avellana* sur gélose à partir de spores. *Ann. Phytopathol.* 9: 531.
- FONTANA A., 1968 - Miceli di fungi ipogei in coltura pura. Atti I Congr. Intern. sul Tartufo, Spoleto, 9 p.
- FONTANA A., 1971 - Il micelio di *Tuber melanosporum* in coltura pura. *Allionia* 17: 19-23.
- FORTAS Z., 1990 - Etude de trois espèces de Terfezia: caractères cultureux et cytologie du mycélium isolé et associé à *Helianthemum guttatum*. Thèse Doct. Univ. Oran, 166 p.
- GRENTE J., CHEVALIER G. et POLLACSEK A., 1972 - La germination de l'ascospore de *Tuber melanosporum* et la synthèse sporale des mycorhizes. *Compt. Rend. Hebd. Séances Acad. Sci.*, série D, 275: 743-746.
- HEWITT E.J., 1966 - Sand and water culture methods in the study of plant nutrition. In: Techn. Comm. n° 22 (2nd ed., revised). London, Commonwealth Agricultural Bureau, 547 p.
- KULIFAJ M., 1984 - *Tuber melanosporum* Vitt.: Contribution à l'étude de la morphogénèse et de la physiologie de l'ascocarpe. Thèse Doct. 3ème cycle, Univ. P. Sabatier, Toulouse, 72 p.
- MELENDEZ-HOWELL L.M. et CAILLEUX R., 1971 - Présence d'un pore germinatif sporale chez quelques espèces du genre *Tuber* Mich. ex Fr. *Compt. Rend. Hebd. Séances Acad. Sci.*, série D, 273: 2485-2488.



- MICHAELS T.J., 1982 - *In vitro* culture and growth modeling of *Tuber spp.* and inoculation of hardwoods with *Tuber melanosporum* ascospores. Ph. D. Thesis, Oregon St. Univ., 120 p.
- MORIZET J. et MINGEAU M., 1976 - Influence des facteurs du milieu sur l'absorption hydrique. Etude effectuée sur la tomate décapitée en exsudation. *Ann. Agron. (Paris)* 27: 183-205.
- RAVOLANIRINA F., 1986 - Etude de l'influence de quelques facteurs sur la croissance mycélienne des Terfez *in vitro* et synthèse des mycorhizes. D.E.A. Biol. Physiol. Vég., Univ. Clermont-Ferrand II, 70 p.
- ROUQUEROL T. et PAYRE H., 1975a - Observation sur le comportement de *Tuber melanosporum* dans un site naturel. *Rev. Mycol.(Paris)* 39: 107-117.
- ROUQUEROL T. et PAYRE H., 1975b - Conséquences de quelques particularités des *Tuber* sur les caractères des cultures de mycélium et sur la formation des truffes. *Rev. Mycol.(Paris)* 39: 213-222.



## FUNGAL FLORA AND AFLATOXIN ASSOCIATED WITH COCOA, ROASTED COFFEE AND TEA POWDERS IN EGYPT

A.I.I. ABDEL-HAFEZ and O.M.O. EL-MAGHRABY

Botany Department, Faculty of Science, Assiut University, Sohag,  
Egypt

**ABSTRACT** - 47 species and 2 varieties belonging to 26 genera of fungi were collected from cocoa, roasted coffee and tea powders on glucose- and cellulose-Czapek-Dox (free from sucrose) agar at 28 and 45°C. The results obtained on the two types of media were basically similar and the most common fungi (at 28°C) in the three substrates were: *Aspergillus flavus*, *A. fumigatus*, *A. niger* and *Penicillium chrysogenum*. Some fungi were prevalent only in one or two substrates on the two types of media such as *A. flavus* var. *columnaris* in cocoa and coffee, and *Mucor hiemalis* in cocoa. On the other hand some fungi were common only on cellulose agar as *A. sydowii*, *Cladosporium herbarum*, *Emericella nidulans* and *P. duclauxi* in cocoa; *P. brevicompactum*, *Rhizopus stolonifer* and *Stachybotrys atra* in coffee; *P. cyclopium* and *Scopulariopsis brevicaulis* in tea; and *Chaetomium globosum* in cocoa and tea. *A. fumigatus* was also the most common thermophilic (or thermo-tolerant) fungus in the three substrates. *Rhizomucor pusillus*, a true thermophile, was recovered rarely from cocoa and roasted coffee.

Six samples (2 and 4 samples of cocoa and tea, respectively) proved to be toxic to brine shrimp (*Artemia salina*) larvae. Thin-layer chromatographic analysis revealed that the toxic samples were contaminated by aflatoxins B<sub>1</sub> and B<sub>2</sub> (2.8-21.7 µg/kg). Experimental infection of the different substrates by *A. flavus* Link (CMF, 102135) proved that tea was more susceptible for aflatoxin contamination.

**RÉSUMÉ** - 26 genres de champignons (47 esp. + 2 var.) ont été isolés à partir de poudres de cacao, café torréfié et thé, sur milieux Czapek-glucose et -cellulose à 28 et 45°C. Les résultats obtenus sur ces deux milieux sont similaires et les champignons les plus communs, pour les 3 substrats et à 28°C, sont: *Aspergillus flavus*, *A. fumigatus*, *A. niger* et *Penicillium chrysogenum*. Quelques champignons n'apparaissent que sur 1 ou 2 substrats: *A. flavus* var. *columnaris* pour le café et le cacao, *Mucor hiemalis* pour le cacao. D'autres champignons sont fréquents uniquement sur milieu cellulose: *A. sydowii*, *Cladosporium herbarum*, *Emericella nidulans* et *P. duclauxi* chez le cacao; *P. brevicompactum*, *Rhizopus stolonifer* et *Stachybotrys atra* chez le café; *P. cyclopium* et *Scopulariopsis brevicaulis* chez le thé; *Chaetomium globosum* chez le cacao et le thé; *A. fumigatus* est le champignon thermophile (ou thermotolerant) le plus commun des 3 substrats. *Rhizomucor pusillus*, thermophile vrai, est rarement rencontré chez le café et le cacao.

6 échantillons (2 pour le cacao, 4 pour le thé) sont toxiques pour les larves d'*Artemia salina*. Les chromatographies en couche mince révèlent que ces échantillons sont contaminés par des aflatoxines B<sub>1</sub> et B<sub>2</sub>. L'infection expérimentale des différents substrats par *A. flavus* montre que le thé est le plus sensible à la contamination par les aflatoxines.

**KEY WORDS** : Cocoa fungi, roasted coffee fungi, tea fungi, aflatoxin.

## INTRODUCTION

Almost 100% of the annual world of green coffee, cocoa beans and tea are produced in developing countries. Latin America and Africa are the main producers of cocoa and coffee, whereas South of Asia is the main producer of tea in the world (FAO, 1988).

Spores of several fungi are always present in large numbers and have the ability to grow on foods, animal feeds or the raw materials used in the manufacture of these commodities. In Egypt, several investigations have been carried out on fungi contaminated seeds and grains (Moubasher et al., 1972; Abdel-Kader et al., 1979; El-Kady et al., 1982a; Abdel-Hafez et al., 1987, Abdel-Hafez, 1988; El-Maghraby & El-Maraghy, 1988; Abdel-Mallek et al., 1990), animal feed stuffs (El-Maghraby, 1989) and human foods (Abdel-Naser, 1990), but none of these studies have been conducted on cocoa, roasted coffee and tea powders commonly used in Egypt as soft drinks (with or without sugar or milk). Also, cocoa is widely used in sweet manufacture, especially chocolate.

Many filamentous fungi are able to produce a wide range of secondary metabolites. Some of these metabolites are pigments, some have antibiotic properties and others are mycotoxins. The mycotoxins are metabolites which cause illness or death on human, or his domesticated animals, following consumption of a domesticated food. The illness itself is referred to mycotoxicosis. Among these mycotoxins are the aflatoxins which are secondary metabolites produced by *Aspergillus flavus* and *A. parasiticus*. Their recognition as potent carcinogens in human and some animal has made them the subjects of government legislation as well as valuable tools, in the study of cancer (Moss & Smith, 1985). In Egypt, the contamination of several commodities such as seeds, grains, meat products and other food and feed stuffs have been carried out (Abdel-Hafez & El-Maghraby, 1987; Abdel-Hafez et al., 1987 a, b; El-Maghraby & El-Maghraby, 1987, 1988; Abdel-Naser, 1990).

The present investigation aimed at studying the contamination of coffee, cocoa and tea powders with filamentous fungi, as well as mycotoxins. Also, the production of aflatoxins B<sub>1</sub> and B<sub>2</sub> on the above three substrates by *Aspergillus flavus* (CMI 102135) were also studied.

## MATERIALS AND METHODS

Twenty samples of each of cocoa, roasted coffee and tea powders (about 100-150g each) were collected from different markets from five Governorates in Upper Egypt namely; El-Minya, Assiut, Sohag, Qena and Aswan. Four samples of each substrate were collected from each Governorate. Each sample was placed in a sterile polyethylene bag and transferred to the Mycological laboratory and kept in a cool place (3-5°C) till fungal and mycotoxins analysis.

### Determination of moisture content

Each substrate was dried in an oven for 24 h at 105°C, then cooled in a dessicator and re-weighed. The moisture content is expressed as percentage of the dry weight.

### Determination of fungi

The dilution-plate method as described by Johnson & Curl (1972) was used for isolation of fungi. Czapek-Dox agar basal medium (g./litre: sodium nitrate 3.0; magnesium sulfate 0.5; potassium chloride 0.5; iron sulfate 0.01; di-potassium hydrogen phosphate 1.0; agar-agar 15.0; pH 7.3±0.1) in which the 3% sucrose were substituted separately with either of 1% glucose or 2% microcrystalline cellulose, were used for isolation of glucophilic and cellulose-decomposing fungi respectively. These two carbon sources, added separately in basal medium, are suitable for isolation of a wide range of fungal species from the three tested substrates. Streptomycin (20 U/ml) and rose bengal (30 ppm) were added to the medium as bacteriostatic agents. Fifteen plates (5 plates for each type of medium and the other 5 plates for thermophilic fungi) were used for each sample. Plates were incubated at 28°C (mesophilic fungi) or 45°C (for thermophilic and thermotolerant fungi) for 1-2 weeks and the developing fungi were identified, counted and the numbers were calculated per g of each substrate.

The following references were used for the identification of fungi (purely morphologically; based on macro- and microscopic characteristics): Raper & Fennell (1965), Ellis (1971), Booth (1971), Pitt (1979), Domsch et al. (1980), Ramirez (1982), Sivanesan (1984).

### Mycotoxins analysis

#### 1- Extraction procedure

25 g of each sample of coffee, cocoa and tea powders were transferred to 250ml Erlenmeyer flask containing 150ml of 80% acetone-water and placed on rotary shaker for 24h. The solvent was decanted off and re-extraction by 150ml of acetone. The acetone extracts were combined and filtered through Whatman n° 1 filter paper. The aqueous acetone solution was reduced in volume by flash evaporation and the filtrate washed twice with 50ml n-hexane in a 250ml separatory funnels, and the n-hexane layer was discarded. The resulting solution was extracted with chloroform (three time, 50ml each). The extracts were combined and traces of water were removed with anhydrous Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. The chloroform extract was concentrated in vacuum and the dry material was transferred to 1-dram vials with small amounts of chloroform, and the solution was evaporated to neat dryness under a stream of nitrogen.

#### 2- Clean up of the crude extracts

The dry material was suspended in 50ml chloroform and applied to silica gel column (200 mesh, Merck) (A.O.A.C., 1980). The column was washed with 150ml n-hexane, followed by 150ml ether, and aflatoxins were eluted with 150ml of 3% methanol-chloroform, which was then concentrated under a stream of nitrogen.

#### 3- Chemical detection of mycotoxins

For qualitative detection of mycotoxins, thin layer chromatography technique was used using precoated silica gel 60 plates (E, Merck, Germany). Aflatoxins B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> & G<sub>2</sub>; ochratoxins A & B; sterigmatocystin, T-2 toxin and diacetoxyscirpenol were applied as standard references. All of mycotoxin standards used through this study were kindly provided by Prof. Dr. G.A. Bean, University of Maryland, U.S.A. The developing solvent system was methanol-chloroform (V/V, 3:97) and the developed plates were viewed under short wavelength UV (252nm) light (A.O.A.C., 1980). For quantitative determination of aflatox-

ins, the fluorescent zones, including standards, were removed from the plates and the aflatoxins were dissolved in chloroform. The concentrations were determined spectrophotometrically (Cecil model 703 spectrophotometer) using the molecular coefficient of 21,800 at 362nm as reported by Asao et al. (1963).

Presence of ochratoxins was confirmed by formation of the fluorescent methyl esters according to the method described by Nesheim et al. (1973). Reaction with trifluoroacetic anhydride had been also applied for derivatization of ochratoxin A (Broce, 1970).

Presence of sterigmatocystin was confirmed according to the method of Josefsson & Moller (1977).

Diacetoxyscirpenol and T-2 toxins were confirmed according to the method described by Takitani et al. (1979).

#### Substrates and inoculation with *Aspergillus flavus*

50g of each of moistened (40% H<sub>2</sub>O) autoclaved substrate (cocoa, roasted coffee or tea) in 500ml Erlenmeyer flask were inoculated with 5ml spore suspension (approximately  $7 \times 10^{10}$  conidia) of *Aspergillus flavus* (CMI, 102135). The cultures were incubated at  $28^\circ \pm 1^\circ\text{C}$  for 2 weeks and then at  $10^\circ \pm 1^\circ\text{C}$  for another 2 weeks. 25g of the samples were transferred to 250ml Erlenmeyer flask containing 100ml of chloroform and placed on rotary shaker for 24h. The chloroform extract was filtered, concentrated, transferred to 1-dram vial, and the solution was evaporated under a stream of nitrogen. The dry material was cleaned up as previously mentioned.

#### Brine shrimp test

For mycotoxins-bioassay, brine shrimp (*Artemia salina* L.) larvae were used according to the method described by Korpinen (1974). 20 $\mu\text{g}$  of the previous extracts were added to 2ml sea water containing 60-100 larvae. After 24h, the percentage of mortality was determined.

## RESULTS AND DISCUSSION

The moisture content of cocoa, roasted coffee and tea powder samples was considerably low and ranged between 2.8-3.9%, 2.1-4.9% and 5.3-8.1%, respectively.

#### Glucophilic fungi (species growing on Czapek-Dox medium with glucose at 28°C)

The total count of filamentous glucophilic fungi in samples tested widely fluctuated between 120-1050, 110-980 and 160-1280 colonies/g of cocoa, roasted coffee and tea powders, respectively. It is worthy to mention that samples with high values of moisture contents coincided with high numbers of fungi and vice versa.

Forty-four species and one variety belonging to 25 genera were collected from cocoa (11 genera, 23 species + 1 var.), coffee (16 genera, 26 species + 1 var.) and tea powders (11 genera, 24 species + 1 var.) on glucose-Czapek-Dox agar (free from sucrose) at 28°C (Tables 1-2). All of these fungi were firstly isolated from the above three substrates in Egypt, but almost the majority of them were found previously from seeds and grains by several researchers.

Genera	Glucose-Cz.						Cellulose-Cz.					
	Cocoa		Coffee		Tea		Cocoa		Coffee		Tea	
	%C	%F	%C	%F	%C	%F	%C	%F	%C	%F	%C	%F
<i>Acronium</i> (1)	-	-	-	-	0.7	10	-	-	0.5	10	-	-
<i>Alternaria</i> (1)	-	-	-	-	0.3	10	-	-	0.5	5	-	-
<i>Aspergillus</i> (11+1 variety)	84.1	100	74.4	100	74.7	100	79.2	100	71.8	100	75.7	75
<i>Botryotrichum</i> (1)	-	-	0.3	5	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Chaetomium</i> (1)	-	-	-	-	0.8	10	0.7	15	0.9	10	3.7	20
<i>Cladospodium</i> (3)	-	-	3.3	40	2.1	35	0.8	15	2.0	20	0.2	5
<i>Cochliobolus</i> (1)	-	-	0.1	5	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Cunninghamella</i> (1)	0.5	5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Emericella</i> (1)	0.3	10	-	-	-	-	0.9	15	0.7	10	0.1	5
<i>Eurotium</i> (7)	0.1	5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Fennellia</i> (1)	-	-	0.3	5	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Fusarium</i> (1)	0.4	5	0.3	5	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Gibberella</i> (1)	5.6	5	-	-	-	-	6.4	5	-	-	-	-
<i>Geotrichum</i> (1)	-	-	2.4	20	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Mucor</i> (2)	1.7	30	0.5	5	1.1	15	2.4	45	1.9	20	-	-
<i>Hydrothecium</i> (1)	-	-	0.6	25	-	-	-	-	0.7	10	-	-
<i>Nectria</i> (1)	-	-	0.3	5	-	-	-	-	0.3	5	-	-
<i>Paecliomycetes</i> (1)	0.2	10	0.5	15	3.9	40	1.5	25	1.3	15	3.7	20
<i>Penicillium</i> (9)	5.9	60	12.7	70	14.4	55	7.0	50	13.8	55	14.0	40
<i>Rhizopus</i> (1)	0.2	5	0.1	10	0.3	10	-	-	2.6	20	0.1	10
<i>Scopulariopsis</i> (1)	-	-	0.7	5	1.0	15	0.6	10	0.6	5	2.5	25
<i>Stachybotrys</i> (1)	-	-	0.1	5	-	-	-	-	2.2	20	-	-
<i>Syncephalastrum</i> (1)	1.0	20	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Trichoderma</i> (1)	-	-	0.1	5	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Ulocladium</i> (1)	-	-	-	-	0.7	10	-	-	-	-	-	-
<i>Mycelia sterilia</i>	-	-	2.4	25	-	-	0.5	10	0.2	5	-	-
% Total count	100		100		100		100		100		100	
Number of genera = 25	11		16		11		9		14		8	
Number of species=46+1 var.	23+1 var.		26+1 var.		24		18+1 var.		23+1 var.		14	

Figures between parenthesis refer to the number of species.

Table 1. - Percentage counts (%C, calculated per total fungi) and percentage frequency of occurrence (%F, calculated per 20 cases) of various fungal genera recovered from cocoa, coffee and tea powders on glucose- and cellulose-Czapek-Dox (free from sucrose) agar at 28°C.

Tableau 1. - Fréquences d'isolement des différents genres de champignons obtenus à partir des poudres de cacao, café et thé sur milieux Czapek-glucose et -cellulose à 28°C.

*Aspergillus* was the most prevalent genus and was encountered from all samples comprising 84.1, 74.4 and 74.7% of total fungi in cocoa, coffee and tea, respectively. It was represented by 9 species and 1 variety (9+1, 6+1 var. and 7 species in cocoa, coffee and tea, respectively) of which *A. flavus*, *A. fumigatus* and *A. niger* were the most common in the three substrates. They emerged in

Table 2. - Total counts (TC, calculated per g dry substrate), number of cases of isolation (NCI, out of 20) and occurrence remarks (OR) of various fungal genera and species recovered from cocoa, coffee and tea powders on glucose- and cellulose-Czapek-Dox (free from sucrose) agar at 28°C.

Tableau 2. - Genres et espèces de champignons isolés à partir de poudres de thé, café et cacao, sur milieux Czapek-glucose et -cellulose à 28°C.

Genera and species	Glucose-Cz.						Cellulose-Cz.					
	Cocoa		Coffee		Tea		Cocoa		Coffee		Tea	
	TC	NCI & OR	TC	NCI & OR	TC	NCI & OR	TC	NCI & OR	TC	NCI & OR	TC	NCI & OR
<i>Acromonium strictum</i> W. Gams	-	-	-	-	80	2 R	-	-	30	2 R	-	-
<i>Alternaria alternata</i> (Fries) Keissler	-	-	-	-	40	2 R	-	-	30	1 R	-	-
<i>Aspergillus</i> (total count)	8970	20 H	6080	20 H	9140	20 H	6210	20 H	4920	20 H	6590	15 H
<i>A. candidus</i> Link	-	-	-	-	-	-	-	-	20	1 R	-	-
<i>A. flavus</i> Link	2260	17 H	2210	19 H	2020	13 H	1870	15 H	1180	12 H	1620	11 H
<i>A. flavus</i> var. <i>columaris</i> Raper & Fennell	1710	14 H	1630	11 H	-	-	1080	18 H	1940	15 H	-	-
<i>A. fumigatus</i> Fresenius	3110	19 H	580	9 M	2050	14 H	2450	19 H	340	6 M	1500	13 H
<i>A. niger</i> Van Tieghem	1570	15 H	1390	18 H	4540	19 H	650	13 H	1320	17 H	3260	16 H
<i>A. niveus</i> Blochwitz	30	2 R	-	-	-	-	20	1 R	-	-	-	-
<i>A. ochraceus</i> Willelm	-	-	-	-	-	-	10	1 R	-	-	-	-
<i>A. parasiticus</i> Spearce	120	2 R	-	-	280	3 L	-	-	-	-	-	-
<i>A. sydowii</i> (Bain. & Sart.) Thom & Church	110	3 L	140	4 L	200	3 L	110	4 L	-	-	-	-
<i>A. versicolor</i> (Vuill.) Tirab.	20	2 R	-	-	-	-	-	-	-	-	10	1 R
<i>A. camarii</i> Kita	-	-	20	1 R	20	1 R	20	2 R	-	-	-	-
<i>A. terreus</i> Thom	40	4 L	110	3 L	30	1 R	-	-	120	2 R	-	-
<i>Botryotrichum atrogriseum</i> Van Beyma	-	-	20	1 R	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Chaetomium globosum</i> Kunze	-	-	-	-	100	2 R	50	3 L	60	2 R	320	4 L
<i>Cladosporium</i> (total count)	-	-	270	8 M	260	7 M	60	3 R	140	4 R	20	1 R
<i>C. cladosporioides</i> (Fres.) de Vries	-	-	120	3 L	140	4 L	20	2 R	80	3 R	20	1 R
<i>C. herbarum</i> (Pers.) Link	-	-	140	6 M	100	3 L	40	3 L	60	2 R	-	-
<i>C. macrocarpum</i> Preuss	-	-	10	1 R	20	1 R	-	-	-	-	-	-
<i>Cochliobolus spicifer</i> Nelson	-	-	10	1 R	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Cunninghamia echinulata</i> Thaxter	50	1 R	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Emricollia nidulans</i> (Eidam) Vuillemin	30	2 R	-	-	-	-	70	3 L	50	2 R	10	1 R
<i>Eurotium chevalieri</i> Mangin	10	1 R	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Fennellia flavipes</i> Wiley & Simons	-	-	20	1 R	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Fusarium oxysporum</i> Scliecht	40	1 R	20	1 R	-	-	-	-	-	-	-	-



Genera and species	Glucose-Cz.						Cellulose-Cz.					
	Cocoa		Coffee		Tea		Cocoa		Coffee		Tea	
	TC	NCI & OR	TC	NCI & OR	TC	NCI & OR	TC	NCI & OR	TC	NCI & OR	TC	NCI & OR
<i>Gibberella fujikuroi</i> (Sawada) Ito	600	1 R	-	-	-	-	500	1 R	-	-	-	-
<i>Geotrichum candidum</i> Link	-	6 M	200	4 L	-	-	190	9 M	130	4 L	-	-
Mucor (total count)	120	3 L	40	1 R	140	3 L	-	-	130	4 L	-	-
<i>M. circinelloides</i> Van Tieghem	60	4 L	40	1 R	140	3 L	190	9 M	-	-	-	-
<i>M. hiemalis</i> Wehner	-	-	50	5 L	-	-	-	-	50	2 R	-	-
<i>Murochechium verrucaria</i> (Atb. ■ Sch.) Dit.	-	-	20	1 R	-	-	-	-	20	1 R	-	-
<i>Nectria haematococca</i> Berkeley & Brown	20	2 R	40	3 L	480	8 M	120	5 L	90	3 L	320	4 L
<i>Paecilomyces variotii</i> Bainier	630	12 H	1040	14 H	1760	11 H	550	10 M	950	11 H	1220	8 M
<i>Penicillium</i> (total count)	-	-	-	-	60	1 R	-	-	-	-	-	-
<i>P. albidum</i> Sopp	60	2 R	80	3 L	-	-	-	-	160	5 L	-	-
<i>P. brevis-compactum</i> Dierckx	420	11 H	310	8 M	1100	9 M	210	8 M	150	4 L	720	5 L
<i>P. chrysogenum</i> Thom	60	1 R	60	2 R	80	3 L	-	-	-	-	20	1 R
<i>P. citrinum</i> Thom	10	1 R	-	-	-	-	-	-	-	-	30	1 R
<i>P. corylophilum</i> Dierckx	-	-	-	-	340	5 L	-	-	30	1 R	360	3 L
<i>P. cyclophilum</i> Westling	-	-	-	-	-	-	230	5 L	70	2 R	-	-
<i>P. duclauxii</i> Delacroix	-	-	-	-	160	3 L	110	■ L	540	6 M	120	2 R
<i>P. funiculosum</i> Thom	80	2 R	590	4 L	20	1 R	-	-	-	-	-	-
<i>P. jensenii</i> Zaleski	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Rhizopus stolonifer</i> (Ehrenb.) Lindt	20	1 R	80	2 R	30	2 R	-	-	180	4 L	10	1 R
<i>Scopulariopsis brevicaulis</i> (Sacc.) Bainier	-	-	60	1 R	120	3 L	50	2 R	40	1 R	220	5 L
<i>Stachybotrys atra</i> Corda	-	-	10	1 R	-	-	-	-	150	4 L	-	-
<i>Syncephalastrum racemosum</i> (Cohn) Schroeter	110	4 L	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Trichoderma viride</i> Pers.	-	-	10	1 R	80	2 R	-	-	-	-	-	-
<i>Ulocladium botrytis</i> Preuss	-	-	200	5 L	-	-	40	2 R	10	1 R	-	-
<i>Mycelia sterilia</i> (white & dark colour)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Gross total count	10660		8170		12230		7840		6850		8710	
Number of genera = 25	11		16		11		9		14		8	
Number of species = 46+1 var.	23+1 var.		26+1 var.		24		18+1 var.		23+1 var.		14	

Occurrence remarks {OR}: H= high occurrence (between 11-20 cases; out of 20), M= moderate occurrence (between 6-10 cases), L= low occurrence (between 3-5 cases), R= rare occurrence (1 or 2 cases).

45-95% of the samples contributing 9.54-49.67% of total *Aspergillus* and 7.1-37.1% of total fungi. *A. flavus* var. *columnaris* was recovered only, in high incidence, from cocoa and coffee. It occurred in 70 and 55% of the samples matching 19.06 and 26.8% of total *Aspergillus* and 16.04 and 19.95% of total fungi, respectively. Abdel-Kader & Al-Hubaishi (1985) isolated 12 species of *Aspergillus* from 20 samples of coffee fruits collected from Yemen Arab Republic and the most common species were *A. flavus*, *A. niger*, *A. ustus* and *A. terreus*. The above species were also common on animal feed stuffs, human food and various types of seeds and grains in Egypt (Moubasher et al., 1972; El-Kady et al., 1982a,b; Abdel-Hafez et al., 1987a; Abdel-Hafez, 1988; Abdel-Naser, 1990) or in many parts of the world (Salcado & De Carvalho, 1980; Supriaman & Palmer, 1981; Abdel-Hafez, 1984). *A. sydowii* and *A. terreus* in three substrates; *A. niveus* and *A. versicolor* in cocoa; *A. parasiticus* in cocoa and tea; and *A. tamarii* in coffee and tea were isolated in low or rare frequency of occurrence. The above *Aspergillus* species were infrequently encountered from various substrates in different places of the world (Domsch et al., 1980).

*Penicillium* ranked second in the number of cases of isolation and was recovered from 60, 70 and 55% of the samples constituting 5.9, 12.7 and 14.4% of total fungi in cocoa, coffee and tea, respectively. Of the genus 8 species were collected of which *P. chrysogenum* was the most common in the three substrates. It occurred in 55, 40 and 45% of the samples matching 66.6, 29.8 and 62.5% of total *Penicillium* and 3.94, 3.79 and 8.99% of total fungi, respectively. *P. citrinum* and *P. funiculosum* in the three substrates; *P. brevi-compactum* in cocoa and coffee; *P. corylophilum* in cocoa; and *P. albidum*, *P. cyclopium* and *P. jensenii* in tea were encountered in low or rare incidence. Levi & Barker (1968) isolated several members of *Penicillium* from green coffee beans. Abdel-Kader & Al-Hubashi (1985) collected 11 species of *Penicillium* from coffee fruits in Yemen and the most common were *P. chrysogenum*, *P. funiculosum* and *P. notatum*. Also the previous species have been found to contaminate various types of seeds and grains in Egypt (Moubasher et al., 1972; El-Kady et al., 1982a; Abdel-Hafez et al., 1987; Abdel-Mallek et al., 1990; El-Maghraby & El-Maraghy, 1987), as well as on various substrates all over the world (Domsch et al., 1980).

*Cladosporium* (represented by *C. cladosporioides*, *C. herbarum* and *C. macrocarpum*) in coffee and tea; *Mucor* (*M. circinelloides* and *M. hiemalis*) in cocoa; and *Paecilomyces* (*P. variotii*) in tea were recovered in moderate frequency of occurrence, but in the other substrates were completely missed or encountered in low or rare incidence (Table 2). *C. cladosporioides*, *C. herbarum*, *C. macrocarpum* and *M. hiemalis* had been found, but with various numbers and incidence, on coffee fruits from Yemen (Abdel-Kader & El-Hubaishi, 1985).

*Acremonium* (*A. strictum*), *Alternaria* (*A. alternata*), *Botryotrichum* (*B. atrogriseum*), *Chaetomium* (*C. globosum*), *Cochliobolus* (*C. spicifer*), *Cunninghamella* (*C. echinulata*), *Emericella* (*E. nidulans*), *Eurotium* (*E. chevalieri*), *Fennellia* (*F. flavipes*), *Fusarium* (*F. oxysporum*), *Gibberella* (*G. fujikuroi*), *Geotrichum* (*G. candidum*), *Myrothecium* (*M. verrucaria*), *Nectria* (*N. haematococca*), *Rhizopus* (*R. stolonifer*), *Scopulariopsis* (*S. brevicaulis*), *Stachybotrys* (*S. atra*), *Syncephalastrum* (*S. racemosum*), *Trichoderma* (*T. viride*), *Ulocladium* (*U. botrytis*) and mycelia sterilia were infrequently encountered from one or more substrates (Table 2). Most of these fungi were associated with various types of seeds and grains, food and feed stuffs and other substrates in Egypt and in many parts of the world as reported by several investigators.

### Cellulose-decomposing fungi (species growing on Czapek-Dox medium with cellulose at 28°C)

Thirty-one species and 1 variety belonging to 15 genera were collected from cocoa (9 genera, 18 species + 1 var.), coffee (14 genera, 23 species + 1 var.) and tea powders (8 genera, 14 species) on plates of cellulose-Czapek-Dox (free from sucrose) agar at 28°C (Tables 1-2). The total count of cellulose-decomposing fungi ranged between 100-860, 80-660 and 120-740 colonies/g dry weight of each of cocoa, roasted coffee and tea respectively. The results obtained in plates of cellulose agar were basically similar to those on glucose agar and the most common fungi in the three substrates were: *Aspergillus flavus*, *A. fumigatus*, *A. niger*, *Paecilomyces variotii* and *Penicillium chrysogenum*. Some fungi were prevalent in one of two substrates such as *A. flavus* var. *columnaris* and *P. funiculosum* in cocoa and coffee; *A. sydowii*, *Cladosporium herbarum*, *Emericella nidulans*, *Mucor hiemalis* and *P. duclauxii* in cocoa; *M. circinelloides*, *P. brevi-compactum*, *Rhizopus stolonifer* and *Stachybotrys atra* in coffee; *P. cyclopium*, *Scopulariopsis brevicaulis* in tea; and *Chaetomium globosum* in cocoa and tea. Al-Hubaishi & Abdel-Kader (1985) found that the most prevalent fungi associated with coffee fruits of Yemen on plates of cellulose agar were: *Alternaria alternata*, *Aspergillus flavus*, *A. niger*, *A. ochraceus*, *Chaetomium globosum*, *Cladosporium herbarum*, *Fusarium oxysporum*, *Penicillium notatum* and *Phoma humicola*. Several of the above fungi were encountered, but with different numbers and frequency of occurrence, from Egyptian seeds and grains on cellulose agar plates (Abdel-Hafez & Abdel-Kader, 1980; Mazen et al., 1984; Abdel-Hafez et al., 1987a; Abdel-Hafez, 1988). Also, all fungal species recovered on plates of cellulose agar were reported to be cellulose-decomposing but with different ability as reported by several researchers. The remaining species were less frequently encountered (Table 2).

### Thermophilic and thermotolerant fungi (species growing on Czapek-Dox medium with glucose at 45°C).

Seven species and 1 variety belonging to 4 genera were collected from cocoa (3 genera, 6 species), coffee (4 genera, 7 species) and tea powders (3 genera, 5 species + 1 var.) on plates of glucose-Czapek-Dox (free from sucrose) agar at 45°C (Table 3). *Aspergillus fumigatus* was the most common species in the three substrates. It occurred in 100, 60 and 80% of the samples matching 93.88, 61.7 and 94.8% of total *Aspergillus* and 89.03, 56.8 and 89.57% of total fungi in cocoa, roasted coffee and tea powders, respectively. *A. fumigatus* has long been known as thermophilic fungus. But Cooney & Emerson (1964) consider it as thermotolerant as it has a maximum near to 50°C, but a minimum well below 20°C. This species was also the most common thermophilic (or thermotolerant) fungus found on peanuts (Moubasher et al., 1979), anise, caraway, coriander, cumin and funnel seeds in Egypt (Abdel-Hafez et al., 1987b), as well as on freshly harvested rice seeds from Malaysia (Kuthubutheen, 1979). Moubasher et al., (1982) found that *A. fumigatus* was active colonizer of wheat and broad-bean straws. Sellars et al. (1976) mentioned that *A. fumigatus* could degrade barley husk and produce 1,4  $\beta$ -glucanase and  $\beta$ -glucosidase. *A. flavus*, *A. niger*, *Emericella nidulans*, *E. nidulans* var. *latus*, *Paecilomyces variotii*, *Rhizomucor pusillus* and sterile mycelium were infrequently encountered from one or more substrates. These fungi were also encountered, but with different numbers and incidences, from some Egyptian seeds on plates of glucose-Czapek's medium at 45°C (Moubasher et al., 1979; Abdel-Hafez et al., 1987b). Thermophilic and/or thermotolerant fungi were able to cause serious deterioration of palm kernels (Oso, 1979) and peanuts seeds (Moubasher et al., 1979) during storage.

Genera and species	Cocoa		Coffee		Tea	
	TC	NCI & OR	NCI ■ OR	NCI & OR	NCI & OR	NCI & OR
<i>Aspergillus</i> (total count)	735	20 H	405	18 H	770	19 H
<i>A. flavus</i> Link	25	3 L	110	5 L	15	2 R
<i>A. fumigatus</i> Fresenius	690	20 H	250	12 H	730	16 H
<i>A. niger</i> Van Tieghem	10	2 ■	10	1 R	25	2 R
<i>A. terreus</i> Thom	10	2 R	35	4 L	-	-
<i>Emmericella</i> (total count)	20	3 L	10	2 R	5	1 R
<i>E. nidulans</i> (Eidam)						
Vuillemin	20	3 L	10	2 R	-	-
<i>E. nidulans</i> var. <i>latus</i>						
Thom ■ Raper	-	-	-	-	5	1 R
<i>Paecilomyces variotii</i>						
Bainier	-	-	15	1 R	25	2 R
<i>Rhizomucor pusillus</i> (Lindt)						
Schipper	15	2 R	5	1 R	-	-
Sterile mycelium	5	1 R	5	2 R	15	3 L
Gross total count	775		440		815	
Number of genera = 4		3		4		3
Number of species = 7+1 var.		6		7		5+1 var.

Occurrence remarks (OR): H= high occurrence (between 11-20 cases; out of 20), M= moderate occurrence (between 6-10 cases), L= low occurrence (between 3-5 cases), R= rare occurrence (1 or 2 cases).

Table 3. - Total counts (TC, calculated per g dry substrate), number of cases of isolation (NCI, out of 20) and occurrence remarks (OR) of various fungal genera and species recovered from cocoa, coffee and tea powders on glucose-Czapek-Dox (free from sucrose) agar at 45°C.

Tableau 3. - Genres et espèces de champignons isolés à partir de poudres de cacao, café et thé, sur milieu Czapek-glucose à 45°C.

#### Natural occurrence of aflatoxin

The toxicity test using brine shrimp larvae revealed that the extracts of 2 and 4 samples of cocoa and tea, respectively, were toxic to the test organism. Thin layer chromatographic (TLC) analysis proved that aflatoxins B<sub>1</sub> & B<sub>2</sub> were present in different cocoa and tea substrates (12.6-21.7 and 2.8-18.4 µg/kg in each of cocoa and tea, respectively) (Table 4). These six samples were heavily contaminated with one or two members of *Aspergillus flavus* group (*A. flavus*, *A. flavus* var. *columnaris* or *A. parasiticus*) (Table 4). Roasted coffee samples proved to be free from aflatoxins B<sub>1</sub> & B<sub>2</sub> or other toxins. In this respect, aflatoxin and sterigmatocystin have been previously reported to contaminate green

Substrate number	Moisture content (%)	Brine shrimp* test (% of dead larvae)	Aflatoxin identified ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	Aflatoxins producing fungi
Cocoa				
7	3.9	A	$B_1$ & $B_2$ (21.7 $\mu\text{g}$ )	<i>A. flavus</i> , <i>A. parasiticus</i>
10	3.7	■	$B_1$ ■ $B_2$ (12.6 $\mu\text{g}$ )	<i>A. flavus</i> , <i>A. flavus</i> var. <i>columnaris</i>
Tea				
2	5.8	C	$B_1$ & $B_2$ (3.6 $\mu\text{g}$ )	<i>A. flavus</i>
3	7.3	C	$B_1$ & $B_2$ (4.2 $\mu\text{g}$ )	<i>A. flavus</i> , <i>A. parasiticus</i>
7	8.1	B	$B_1$ & $B_2$ (18.4 $\mu\text{g}$ )	<i>A. flavus</i> , <i>A. parasiticus</i>
20	6.2	C	$B_1$ & $B_2$ (2.8 $\mu\text{g}$ )	<i>A. flavus</i>

\* Brine shrimp test: A= high toxicity, more than 75% mortality of brine shrimp larvae; B= moderate toxicity, between 50-75% mortality of brine shrimp larvae; C= low toxicity, between 25-49 mortality of brine shrimp larvae.

Table 4. - Sample number, substrate type, moisture content (%), biological assay, naturally occurring of aflatoxins identified and common aflatoxin -producing fungi of the toxic samples

Tableau 4 - Test et composition en aflatoxines des échantillons toxiques.

Substrate (25g)	Brine shrimp* test	Aflatoxins production** ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ dry substrate)
Cocoa	A	30
Coffee	C	1.4
Tea	A	72

\* Brine shrimp test: A= high toxicity, more than 75% mortality of brine shrimp larvae; B= moderate toxicity, between 50-75 mortality of brine shrimp larvae; C= low toxicity, between 25-49 mortality of brine shrimp larvae.

\*\* Aflatoxins production: Average of two determination of UV spectrophotometer, where the individual analysis agreed to within  $\pm 10\%$ .

Table 5. - Brine shrimp test and production of aflatoxins on moistened cocoa, roasted coffee and tea powders in relation to their requirements by *Aspergillus flavus* (CMI, 102135).

Tableau 5. - Infection expérimentale de différents substrats par *Aspergillus flavus*, test et production d'aflatoxines.

coffee beans at ■ level of 20-400 $\mu\text{g}/\text{kg}$  (Levi & Barker, 1968; Schroedar & Storey, 1976; FAO, 1979). Also aflatoxins  $B_1$  &  $B_2$  were the only mycotoxins which have been previously recorded as a contaminant of cocoa beans at concentration of 4.87 $\mu\text{g}/\text{kg}$  and also in cocoa products (chocolates) in USA at a level of 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$  (FAO, 1979). In Egypt, aflatoxins have been identified as natural contaminant of some seeds and grains (El-Khadem et al., 1983; Youssef,

1986; El-Maghraby & El-Maraghy, 1987; Sabah Saber, 1987; El-Maghraby, 1989).

Biological assay, TLC analysis and U.V. spectrophotometer proved clearly that tea was more susceptible for contamination by aflatoxins B<sub>1</sub> & B<sub>2</sub> than cocoa (72 and 30 µg/kg dry tea and cocoa, respectively) (Table 5). Coffee is weakly susceptible for production of aflatoxins (1.4 µg/kg coffee). Aflatoxins generally refer to a group of toxic crystalline, highly fluorescent bis-furanocoumarin metabolites produced by *Aspergillus flavus* and *A. parasiticus* (Edds, 1979). Aflatoxin B<sub>1</sub> causes chromosomal aberration and DNA breakage in plant and animal cells. It has been demonstrated to cause mutations in several bacterial test systems (Edds, 1979; Moss & Smith, 1985). El-Zawahri et al. (1977) demonstrated that aflatoxin B<sub>1</sub> is a strong chromosome damaging agent and the treated cells showed a high rate of breaks and interchanges.

In conclusion, mycological analysis of cocoa, coffee and tea powders reveal that these substrates were contaminated with several glucophilic and cellulose-decomposing fungi, especially members of *Aspergillus* and *Penicillium*, but there is no specific fungal characteristic any of these substrates. Also, *A. flavus* was encountered in high frequency of occurrence in the three substrates on glucose- and cellulose-Czapek's agar, where this fungus is well known glucophile, cellulose-decomposer and aflatoxins-producing fungus and was found in large numbers on the contaminated six samples of cocoa and tea powders by aflatoxins B<sub>1</sub> and B<sub>2</sub>. Hence, precautions must be adopted during handling, transport, storage and processing to avoid contamination and serious deterioration of the three substrates by filamentous fungi, since several of these fungi could produce mycotoxins which are harmful to human health. Also some samples of cocoa and tea proved to be contaminated with aflatoxins B<sub>1</sub> & B<sub>2</sub> and these two substrates were more susceptible for production of aflatoxins than roasted coffee.

#### ACKNOWLEDGEMENT

The authors are deeply indebted to Prof. Dr. I.A. El-Kady (Bot. Dept., Fac. of Science, Assiut University) for valuable help. Also many thanks to Prof. Dr. G.A. Bean (Associate Dean, Faculty of Agriculture and Life Science, University of Maryland) for providing us mycotoxin standards.

#### REFERENCES

- ABDEL-HAFEZ S.I.I. and ABDEL-KADER M.I.A., 1980 - Cellulose-decomposing fungi of barley grains in Egypt. *Mycopathologia* 70: 77-82.
- ABDEL-HAFEZ S.I.I., 1984 - Composition of the fungal flora of four cereal grains in Saudi Arabia. *Mycopathologia* 85: 53-57.
- ABDEL-HAFEZ A.I.I. and EL-MAGHRABY O.M.O., 1987 - Mycoflora and mycotoxins of barley grains from Sinai, Egypt. *Sohag Pure & App. Sci. Bull., Fac. Sci., Egypt*, 3: 73-91.
- ABDEL-HAFEZ S.I.I., EL-KADY I.A., MAZEN M.B. and EL-MAGHRABY O.M.O., 1987a - Mycoflora and trichothecene toxins of paddy grains from Egypt. *Mycopathologia* 100: 103-112.
- ABDEL-HAFEZ A.I.I., MOHARRAM A.M.M. and ABDEL-MALLEK A.Y., 1987b - Thermophilic and thermotolerant fungi associated with seeds of five members of Umbelliferae from Egypt. *Cryptogamie, Mycol.* 8: 315-320.

- ABDEL-HAFEZ A.I.I., 1988 - Mycoflora of broad bean, chickpea and lentil seeds in Egypt. *Cryptogamie, Mycol.* 9: 335-343.
- ABDEL-KADER M.I.A., MOUBASHER A.H. and ABDEL-HAFEZ S.I.I., 1979 - Survey of the mycoflora of barley grains in Egypt. *Mycopathologia* 68: 143-147.
- ABDEL-KADER M.I.A. and AL-HUBAISHI A.A.A., 1985 - Preliminary survey of the mycoflora of coffee fruits in Yemen Arab Republic. *Proc. Egypt. Bot. Soc., Ismaillia Conf.* 1: 81-93.
- ABDEL-MALLEK A.Y., ABDEL-HAFEZ A.I.I. and MOHARRAM A.M., 1990 - Contribution to the mycoflora of caraway, coriander and cumin seeds in Egypt. *Bull. Fac. Sci., Assiut Univ.* 19: 1-15.
- ABDEL-NASER A.Z., 1990 - Mycoflora and mycotoxins of some meat products. Ph. D. Thesis, Bot. Dept., Fac. Sci., Assiut Univ., Egypt.
- AL-HUBAISHI A.A.A. and ABDEL-KADER M.I.A., 1985 - Cellulose-decomposing fungi of coffee fruits from Yemen Arab Republic. *Proc. Egypt. Bot. Soc. Ismaillia Conf.* 1: 94-105.
- A.O.A.C., 1980 - Association of Official Analytical Chemists. Official methods of analysis 13th ed. Washington, DC, p. 429.
- ASAO T., BUCHI G., ABDEL-KADER M.M., CHANG S.B., WICK E.L. and WAGAN G.N., 1963 - Aflatoxin B and G. *J. Amer. Chem. Soc.* 85: 1706.
- BOOTH C., 1971 - *The genus Fusarium*. Kew, England, CMI.
- BROCE D., 1970 - The extraction, purification, detection, quantitative measurements and confirmation of ochratoxin A, B and C of *Aspergillus ochraceus*. With Diss. Abstr. Int B. 30: 3059-3060.
- COONEY D.G. and EMERSON R., 1964 - *Thermophilic fungi*. San Francisco, W.H. Freeman Publ. Co.
- DOMSCH K.W., GAMS W. and ANDERSON T., 1980 - *Compendium of soil fungi*. London, Academic press.
- FDDS G.F., 1979 - Aflatoxins. Conference on mycotoxins in animal feeds and grains related to animal health. FDA, Rockville, Maryland, USA. pp. 80-164.
- EL-KADY I.A., ABDEL-HAFEZ S.I.I. and EL-MARAGHY S.S., 1982a - Contribution to the fungal flora of cereal grains in Egypt. *Mycopathologia* 77: 103-109.
- EL-KADY I.A., MAZEN M.B., and SABAH SAHER M., 1982b - Toxicogenic fungi isolated from cotton seeds and cotton seed products. *Bull. Fac. Sci., Assiut Univ.* 11: 151-157.
- EL-KHADEM M., NAGUIB K.H. and NAGUIB M.M., 1983 - Aflatoxins in foodstuff in Egypt. II - Broad beans mycoflora and toxicity. *Proc. Int. Symp. Mycotoxins*. (Sept. 6-8, 1981, Cairo, Egypt): 213-220.
- ELLIS M.B., 1971 - *Dematiaceous Hyphomycetes*. Kew, England, CMI.
- EL-MAGHIRABY O.M.O. and EL-MARAGHY S.S.M., 1987 - Mycoflora and mycotoxins of peanut (*Arachis hypogaea* L.) seeds in Egypt. I - Sugar fungi and natural occurrence of mycotoxins. *Mycopathologia* 98: 165-170.
- EL-MAGHIRABY O.M.O. and EL-MARAGHY S.S.M., 1988 - Mycoflora and mycotoxins of peanut (*Arachis hypogaea* L.) seeds in Egypt. III - Cellulose-decomposing and mycotoxins-producing fungi. *Mycopathologia* 104: 19-24.
- EL-MAGHIRABY O.M.O., 1989 - Contribution to the fungal flora and aflatoxin of straw in Egypt. *Bull. Fac. Sci., Assiut Univ.* 18 (1-D): 119-130.
- EL-ZAWARI M., MOUBASHER A.H., MORAD M. and EL-KADY I.A., 1977 - Mutagenic effects of aflatoxin B<sub>1</sub>. *Ann. Nutr. Aliment.* 13: 859-866.
- F.A.O., 1979 - Food and nutrition paper, perspective on mycotoxins. Food and Agriculture Organization of the United Nations, p. 44-120.

- F.A.O., 1988 - Food and agriculture organization of the United nations. Vol. 42, p. 226-229.
- JOHNSON L.F. and CURL E.A., 1972 - *Methods for research on ecology of soil-borne pathogens*. Minncapolis, Burgess Publ. Co.
- JOSEFSSON B.G.E. and MÜLLER T.E., 1977 - Screening method for the detection of aflatoxins, ochratoxin, patulin, stergmatocystin and zearalenone in cereals. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 60: 1369-1371.
- KORPINEN E.L., 1974 - Studies on *Stachybotrys alternans*. *Acta Pathol. Microbiol. Scan Sect. B.* 28: 462-469.
- KUTHUBUTHEEN A.J., 1979 - Thermophilous fungi associated with freshly harvested rice seeds. *Trans. Brit. Mycol. Soc.* 73: 357-359.
- LEVI C.P. and BARKER E., 1968 - Survey of green coffee for potential aflatoxin contamination. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 51: 600-602.
- MAZEN M.B., ABDEL-HAFEZ S.I.I. and SHABAN G.M.M., 1984 - Survey on the mycoflora of Egyptian wheat grains and their lemmae and paleae. *Mycopathologia* 85: 155-159.
- MOSS M.O. and SMITH J.E., 1985 - *Mycotoxins formation, analysis and significance*. New York, John Wiley & Sons.
- MOUBASHER A.H., EL-NAGHY M.A. and ABDEL-HAFEZ S.I.I., 1972 - Studies on the fungus flora of three grains in Egypt. *Mycopathol. Mycol. Appl.* 47: 261-274.
- MOUBASHER A.H., EL-HISSY F.T., ABDEL-HAFEZ S.I.I. and HASSAN S.K.M., 1979 - The mycoflora of peanuts in Egypt. *Mycopathologia* 86: 39-40.
- MOUBASHER A.H., ABDEL-HAFEZ S.I.I., ABDEL-FATTAH H.M. and MOHARRAM A.M., 1982 - Fungi of wheat and broad-bean straw composts. II- Thermophilic fungi. *Mycopathologia* 78: 169-176.
- NI-SHEIM S., HARDIN N.F., FRANCIS Jr. O.J. and LANGHAM W.S., 1973 - Analysis of ochratoxin A and B and their esters in barley, using partition and thin layer chromatography. 1- Development of the method. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 56: 817-821.
- OSO B.A., 1979 - Thermophilic fungi and deterioration of Nigerian oil palm kernels. *Econ. Bot.* 33: 58-62.
- PITT J.I., 1979 - *The genus Penicillium and its teleomorphic states Eupenicillium and Talaromyces*. North Ryde, Australia, Commonwealth Sci. Indust. Res. Organ., Div. Food Res.
- RAMIREZ C., 1982 - *Manual and atlas of Penicillia*. New York, Elsevier Biomedical Press.
- RAPER K.B. and FENNEL D.J., 1965 - *The genus Aspergillus*. Baltimore, Williams & Wilkins.
- SABAH SABER M., 1987 - Mycotoxin-production by halophilic and osmophilic fungi of different seeds in Egypt. Ph. D. Thesis, Bot. Dept., Fac. Sci. of Sohag, Assiut Univ., Egypt.
- SALCADO T.M. and DE CARVALHO P.C., 1980 - Toxigenic fungi associated to grains. 1- Survey of microflora associated with corn, wheat and rice. *Rev. Microbiol.* 11: 60-63.
- SCHROEDER H.W. and STOREY J.B., 1976 - Developed of aflatoxin in "Stuart" pecans as affected by shell integrity. *Hort. Sci.* 11: 53-54.
- SELLARS P.N., MCGILL C.E.G. and FLANNIGAN B., 1976 - Degradation of barley by *Aspergillus fumigatus* Fres. In: J.M. SHARPLEY & A.M. KAPLAN, *Proceeding of the third international Biodegradation Symposium*. London, Appl. Sci., 635-643.
- SIVANESAN A., 1984 - *The bitunicate Ascomycetes and their anamorphs*. Germany, Strauss and Cramer.



- SUPRIAMAN J. and PALMER L.T., 1981 - Seed-borne fungi of rice in Indonesia. *Contrib. Cent. Res. Inst. Agric. Bogor* 0 (57): 1-12.
- TAKITANI S., ABASA Y., KATO T., SUZUKI M. and UENO Y., 1979 - Spectro-densitometric determination of trichothecene-mycotoxins with 4-(P-nitrobenzyl) pyridine on silica gel, thin layer chromatograms. *J. Chromatog.* 172: 335-342.
- YOUSSEF M.S., 1986 - Mycoflora and mycotoxins of broad bean (*Vicia faba*) in Egypt. M. Sc. Thesis, Bot. Dept., Fac. Sci., Assiut Univ., Egypt.



## INFLUENCIA DEL TIPO DE SUELO SOBRE LAS PAUTAS DE COLONIZACION Y EFICIENCIA EN LA SIMBIOSIS MICORRICICA DE SEIS ESPECIES DE *GLOMUS*

G. DIAZ\*, A. ROLDAN\*\* y J. ALBALADEJO\*\*

\* Depto. Biología Vegetal, Facultad de Biología, Univ. Murcia.  
30071 Murcia, España.

\*\* Centro de Edafología y Biología Aplicada del Segura-CSIC.  
Apdo. 4195, Murcia, España.

**RESUMEN** - Se ha tratado de determinar la efectividad de la simbiosis micorrizica entre *Anthyllis cytisoides* L. y 6 especies de *Glomus*, en 3 tipos de suelo (Torripsamment xérico (A), Torriorthent xérico (B) y Haploxeroll lítico (C)). La respuesta inducida por los endófitos difiere según el tipo de suelo, especialmente en los niveles de colonización radical y de crecimiento. En el suelo A los hongos más efectivos fueron *Glomus etunicatum*, *G. mosseae* y *Glomus* sp., aislados de este suelo. *G. fasciculatum* y *G. macrocarpum* fueron más eficaces en el suelo C. *G. epigaeum* incrementó el crecimiento en los suelos B y C, pero no en A. La absorción de P por la planta parece estar en función del hongo ensayado y es independiente del contenido en este nutriente del suelo.

**ABSTRACT** - An experiment to determine the effectiveness of mycorrhizal symbiosis between *Anthyllis cytisoides* L. and six *Glomus* species was carried out in three soil types (Torripsamment (A), Xeric Torriorthent (B) and Litic Haploxeroll (C)). In soil A, the autochthonous fungi (*Glomus etunicatum*, *G. mosseae* and *Glomus* sp.) were the most effective in growth improvement. *G. fasciculatum* and *G. macrocarpum* were more efficient in soil C. *G. epigaeum* increased growth only in soils B and C. P uptake appears to be related with the asseyed endophyte and independent from P. content in the soil.

**KEY WORDS** : *Glomus*, *Anthyllis cytisoides*, soil type, VA mycorrhizas.

### INTRODUCCION

En zonas áridas y semiáridas, la fragilidad inherente a sus ecosistemas junto con la progresiva degradación y explotación antrópica han provocado que gran parte de estos territorios, entre los que se incluyen amplias zonas del Sureste de España, sufran graves fenómenos de erosión y desertificación. La pérdida de la cobertura vegetal lleva parejo una disminución de los niveles de materia orgánica y nutrientes (fósforo y nitrógeno), lo cual dificulta extraordinariamente el establecimiento de nuevas especies vasculares.

La utilización de micorrizas en prácticas de revegetación es un tema de gran interés (Trappe, 1981; Williams & Allen, 1985). La simbiosis mutualista formada por el hongo endófito y las raíces de la planta revierte en un incremento de la captación de nutrientes, fundamentalmente fósforo (Harley & Smith,

1983; Jeffries, 1987), en una tolerancia a las condiciones de sequía (Nelsen & Safir, 1981, Ibrahim *et al.*, 1990) y en una mayor resistencia frente al ataque de patógenos (Dehne, 1982). Varios trabajos muestran la efectividad de la inoculación de plantas con endomicorrizas vesículo-arbusculares (MVA) en zonas semiáridas (Roskoski *et al.*, 1982; Barca *et al.*, 1990). Entre las diferentes especies vasculares susceptibles de ser utilizadas en acciones de revegetación adquieren especial relevancia las leguminosas, debido a su facultad de formar simbiosis con bacterias fijadoras de nitrógeno (Aziz & Habte, 1990). La selección de hongos MVA adecuados es un tema de capital importancia (Abbott & Robson, 1982), ya que no siempre los endófitos naturales son los más adecuados para establecer una simbiosis efectiva (Barea, 1990). Por otra parte, la capacidad de un hongo MVA para favorecer el crecimiento en simbiosis puede depender de las características del suelo (Hayman & Tavares, 1985).

Este trabajo tiene el propósito de evaluar la influencia del tipo de suelo sobre la efectividad de la simbiosis micorrizica entre *Anthyllis cytisoides* L. (Fabaceae) y seis especies de *Glomus* endófitos.

## MATERIAL Y METODOS

Como planta objeto de la experiencia se ha escogido *Anthyllis cytisoides* L., una leguminosa arbustiva ampliamente extendida en el Sureste español y zonas próximas del Mediterráneo Occidental. Esta especie crece naturalmente en zonas cercanas a la costa con precipitaciones que oscilan desde 200 a 650mm anuales y sobre todo tipo de suelos, ya que está considerada como indiferente edáfica. Las semillas se recolectaron en junio de 1989 en la Sierra de Carrascoy (Murcia), y fueron almacenadas a 4°C hasta su uso. Inmediatamente antes de su siembra fueron sometidas a un proceso mecánico mediante el cual quedaron desprovistas de todas las cubiertas protectoras.

Se utilizaron seis especies de hongos micorrizicos:

*Glomus fasciculatum* (Thaxter sensu Gerd.) Gerd. & Trappe, procedente de la Estación Experimental del Zaidin, Granada.

*G. epigaeum* Daniels & Trappe, procedente de la estación Experimental de Rothamsted, Reino Unido.

*G. macrocarpum* Tul. & Tul., procedente del Instituto de Investigaciones Agrobiológicas de Galicia, Santiago de Compostela.

*G. mosseae* (Nicol. & Gerd.) Gerd. & Trappe; *G. etunicatum* Becker & Gerd. y *Glomus* sp. fueron aislados de la rizosfera de *Medicago sativa* L. que crecía en la Bahía de Portman, La Unión (Murcia).

Estas seis especies de endófitos se cultivaron en macetas con *Medicago sativa* durante al menos 12 meses en condiciones de invernadero. Como inóculo en la experiencia se utilizó en sustrato conteniendo esporas, micelio y fragmentos de raíz infectados. El inóculo se almacenó en bolsas de polietileno a una temperatura de 4°C.

Se seleccionaron tres suelos bien diferenciados en cuanto a las características físico químicas (Tabla 1) y al material original (suelo A: arenas de dudas mezcladas con estériles de explotaciones mineras; suelo B: margas del Triásico; suelo C: rocas calizas). Todos ellos proceden de localidades de la provincia de Murcia con ombroclima semiárido (300mm precipitación media anual) y seriamente afectadas por problemas de desertificación como consecuencia de la degradación química y salinización (suelo A) y degradación biológica y erosión (suelos B y C).

	K asim. (meq/100g)	Na total (meq/100g)	P asim. (ppm)	C orgán. (%)	N ■■■ (%)	Textura	Clasificación*	Procedencia
SUELO A	0,61	14,1	8	0,31	0,047	franco-arenosa	Torrissammeli	Portizán
SUELO B	0,47	0,13	6	0,61	0,034	arcillo-limosa	Tornament ■■■	Abanilla
SUELO C	0,64	0,11	16	3,89	0,068	franco-limosa	Haplaxeroi litico	Santomera

\* Según Soil Survey Staff (1975)

■ According to Soil Survey Staff (1975)

Tabla 1: Características y procedencia de los suelos.

Table 1: Soil characteristics and location.

Como sustrato para el experimento se utilizó una mezcla en proporción 2:1 de cada tipo de suelo con arena (2mm diam.) con el fin de evitar una compactación excesiva. Esta mezcla se esterilizó a 100°C sin presión adicional durante 1h en tres días consecutivos, para eliminar los hongos nativos. Con posterioridad se dispuso el sustrato estéril en recipientes con 350ml de capacidad. Para incorporar la microflora original de cada suelo se adicionaron filtrados extensos de propágulos micorrícicos y un cultivo puro de *Rhizobium* GRH17 (Estación Experimental de Zaidín, Granada).

Fueron establecidas cinco réplicas para cada uno de los hongos inoculados (incluido el control) en cada tipo de suelo (105 réplicas en total) y se dispusieron en una cámara de crecimiento con un fotoperiodo de 16 horas y temperaturas diurnas y nocturnas de 25°C y 20°C respectivamente. La humedad relativa se mantuvo en un 57% y la intensidad luminica se fijó en un flujo de fotones de 420  $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ .

El inóculo micorrícico se adicionó incorporando ocho gramos del mismo a una profundidad de 4cm en cada recipiente, que fueron convenientemente mezclados con el sustrato. Se plantaron un mínimo de 7 semillas en cada recipiente, las plántulas se clarearon inmediatamente después de la germinación y se conservaron dos por recipiente.

El periodo de crecimiento de las plantas fue de 14 semanas, transcurridas las cuales fueron recolectadas. Se cuantificaron los pesos fresco y seco (80°C durante 16 horas) de parte aérea y radical. Porciones de sistema radical fueron utilizadas para determinar los porcentajes de infección según el método de tinción de Phillips & Hayman (1970) y el de cuantificación de Giovannetti & Mosse (1980).

El contenido en fósforo se midió colorimétricamente con reactivo verde malaquita (Fernandez *et al.*, 1985) tras la digestión de las muestras con nitrato perclórico 5:3.

El tratamiento estadístico de los datos se llevó a cabo utilizando análisis de la varianza y las diferencias significativas se establecieron con el test de Duncan (Duncan, 1955).

## RESULTADOS Y DISCUSION

## Repuesta ■ la inoculación en cada tipo de suelo

Los resultados de la experiencia de inoculación en el suelo A (Tabla 2) muestran que todos los hongos endófitos ensayados aumentan la altura de las plántulas de modo significativo. Los hongos que producen un mayor incremento positivo tanto en altura como en peso seco de la parte aérea son *Glomus mosseae*, *G. etunicatum* y, en menor medida, *Glomus* sp.; todos ellos aislados en este mismo suelo, donde se encuentran de forma natural. Los menos efectivos, por el contrario, son *G. epigaeum* y *G. macrocarpum*, ambos procedentes de suelos con características muy diferentes a las del suelo A tanto en composición como en condiciones ambientales.

Con relación al incremento de la parte radical, *G. fasciculatum* y *G. etunicatum* se han revelado como los endófitos con mayor capacidad de aumentar esta parte de la planta. En cambio, y al igual que ocurre con la parte aérea, *G. epigaeum* y *G. macrocarpum* manifiestan una escasa o nula efectividad.

Los niveles de fósforo absorbidos por la planta son siempre mayores en las plantas micorrizadas. Los hongos que provocan un mayor incremento en la absorción de P en el suelo A son *G. mosseae*, *G. etunicatum* y *Glomus* sp.

En el suelo B (Tabla 3) todos los hongos ensayados produjeron incrementos en altura de las plantas con significación estadística ( $p < 0.05$ ) respecto al control. Del mismo modo en todas las plantas micorrizadas se observaron diferencias significativas en el peso de la parte aérea con respecto a las no micorrizadas.

Hongo inoculado	Altura (mm)	Parte aérea Peso fresco (mg/planta)	Parte aérea Peso seco (mg/planta)	Raíz Peso fresco (mg/planta)	Raíz Peso seco (mg/planta)	Infección radical (%)
CONTROL	27 a	54.2 a	7.8 a	20.6 a	3.0 a	0
<i>Glomus fasciculatum</i>	101 cd	733.3 bc	80.2 bc	105.6 abc	45.5 c	77
<i>G. epigaeum</i>	58 ab	200.0 a	19.3 a	53.3 ab	3.6 a	62
<i>G. macrocarpum</i>	76 bc	404.2 ab	39.6 ab	70.8 abc	15.2 ab	73
<i>G. mosseae</i>	92 bcd	960.5 ■	116.7 c	182.5 bcd	27.5 bc	30
<i>G. etunicatum</i>	116 d	1063.7 c	130.3 c	296.6 ■	41.3 c	48
<i>Glomus</i> sp	93 bcd	822.1 c	88.2 bc	218.7 cd	24.2 bc	38

Valores medios ■ cinco repeticiones. Los datos seguidos ■ la misma letra no difieren significativamente para  $P < 0.05$  según ■ test de Duncan.

Values expressed ■ mean of five replicates. Data in ■ column followed by the same letter are not significantly different ( $P < 0.05$ ) as determined by Duncan's test.

Tabla 2: Respuesta de la inoculación de *Anthyllis cytisoides* en el suelo A (Torripsamment).

Table 2: Response to inoculation of *Anthyllis cytisoides* in soil A (Torripsamment).

Hongo inoculado	Altura (mm)	Parte aérea Peso fresco (mg/planta)	Parte aérea Peso seco (mg/planta)	Raíz Peso fresco (mg/planta)	Raíz Peso seco (mg/planta)	Infección radical (%)
CONTROL	38 a	133.2 a	26.6 a	120.4 a	14.5 ■	0
<i>Glomus fasciculatum</i>	75 c	567.8 bc	57.2 ■■	214.8 ab	18.8 c	52
<i>G. epigaeum</i>	56 b	436.6 ■	50.8 bc	169.2 a	13.2 a	46
<i>G. macrocarpum</i>	74 c	601.6 c	68.2 d	355.6 ■■	20.6 c	41
<i>G. mosseae</i>	61 bc	578.2 bc	62.2 cd	206.5 ab	18.5 bc	49
<i>G. etunicatum</i>	68 bc	597.0 c	46.2 b	226.5 ab	19.5 c	36
<i>Glomus sp.</i>	73 c	745.6 d	84.6 e	245.2 ab	25.6 d	40

Valores medios ■ cinco repeticiones. Los datos seguidos de la misma letra no difieren significativamente para  $P < 0.05$  según el test de Duncan.

Values expressed as mean of five replicates. Data in columns followed by the same letter are not significantly different ( $P < 0.05$ ) as determined by Duncan's test.

Table 3: Respuesta de la inoculación de *Anthyllis cytiloides* en el suelo B (Torriorthent xérico).

Table 3: Response to inoculation of *Anthyllis cytiloides* in soil B (xeric Torriorthent).

En el suelo ■ los hongos más efectivos son *Glomus sp.* y *G. macrocarpum*; pero incluso el menos efectivo, *G. etunicatum*, produjo diferencias en peso seco del 76% con respecto al control.

Todos los tratamientos incrementaron positivamente los sistemas radicales con la única excepción de *G. epigaeum* en que, incluso, se observa un ligero descenso en el peso seco de la raíz. Al igual que ocurre para la parte aérea, el endófito que manifiesta una mayor respuesta es *Glomus sp.*

Los hongos más efectivos en la absorción de P son *G. fasciculatum* y *Glomus sp.* *G. epigaeum* es el endófito con menor capacidad de incrementar la absorción de P en el suelo B.

Los datos correspondientes al desarrollo de la experiencia en el suelo C se presentan en la Tabla 4. Todos los hongos inoculados han producido incrementos positivos significativos en altura, peso fresco y seco de la parte aérea y peso seco de la raíz. En este suelo el hongo más efectivo es *G. fasciculatum* que, a su vez, resultó ser el endófito con mayor capacidad infectiva (72%). La menor capacidad infectiva de *G. epigaeum* y *G. etunicatum* se corresponde en este suelo con la menor efectividad.

Los mayores incrementos en la absorción de P se encontraron con *G. mosseae*, *G. fasciculatum* y *Glomus sp.*

### Niveles de infectividad

Los porcentajes de infección de los sistemas radicales se pueden considerar como moderados y usuales en este tipo de estudios (Lioi & Giovannetti, 1987; Sylvia & Burks, 1988). En general, los máximos valores de infectividad se alcanzan en el suelo C. En los tres tipos de suelo ensayados *Glomus fasciculatum* resultó ser el más infectivo, aunque esta capacidad de producir mayor infección no se vió reflejada de modo generalizado en una mayor efecti-

Hongo inoculado	Altura (mm)	Parte aérea Peso fresco (mg/planta)	Parte aérea Peso seco (mg/planta)	Raíz Peso fresco (mg/planta)	Raíz Peso seco (mg/planta)	Infección radical (%)
CONTROL	40 a	121.4 a	26.2 a	38.6 a	9.4 a	0
<i>Glomus fasciculatum</i>	145 f	1546.4 cd	153.5 ■	561.4 c	39.2 c	72
<i>G. epigaeum</i>	81 bc	944.2 bc	73.6 b	390.5 abc	32.6 c	49
<i>G. macrocarpum</i>	113 de	1477.8 cd	107.4 a	416.7 bc	28.4 bc	60
<i>G. mosseae</i>	129 ef	1603.8 cd	117.6 d	604.2 ■	28.4 bc	55
<i>G. etunicatum</i>	73 b	696.2 ab	86.8 bc	159.6 ab	19.6 b	47
<i>Glomus sp</i>	99 ■	1695.4 d	102.8 cd	396.4 abc	33.4 ■	67

Valores medios de cinco repeticiones. Los datos seguidos de la misma letra ni difieren significativamente para  $P < 0.05$  según ■ test de Duncan.

Values expressed as mean of five replicates. Data in a column followed by the same letter are not significantly different ( $P < 0.05$ ) as determined by Duncan's test.

Tabla 4: Respuesta de la inoculación de *Anthyllis cytisoides* en el suelo C (Haploixeroll lítico)

Table 4: Response to inoculation of *Anthyllis cytisoides* in soil C (litic Haploixeroll).

vidad ya que este hongo sólo resultó el más efectivo en incrementar el peso seco en el suelo C y el que produjo la mayor absorción de P en el suelo B.

Cabe destacar es que en el suelo A los hongos con menor capacidad infectiva fueron aquellos que mostraron una mayor capacidad para aumentar el crecimiento y la absorción de P por las plantas. Este comportamiento es general para los tres endófitos aislados en el suelo A. El hecho de que los hongos autóctonos en este suelo consigan la mayor efectividad con los menores porcentajes de infección puede ser un indicio de adaptación ecológica. En condiciones naturales el suelo A recibe escasos aportes hídricos y los niveles de nutrientes son muy bajos; en esta situación parece razonable que se seleccionen hongos endófitos que no supongan un excesivo coste energético para la planta. En suelos más ricos, o con condiciones favorables para el crecimiento de la planta, el gasto energético de trasvase de compuestos hidrocarbonados al hongo puede no ser tan decisivo y limitante para seleccionar binomios hongo/planta viables.

#### Respuesta de los endófitos según el tipo de suelo

La respuesta inducida por los hongos endófitos difiere según el tipo de suelo (Fig. 1). *G. fasciculatum* produce un notable aumento en el crecimiento de la planta en el suelo C (casi tres veces más que en el suelo B). Un caso similar es el de *G. macrocarpum*. *G. epigaeum* muestra una buena efectividad en B y C pero su efecto no difiere significativamente del control en el suelo A. *G. mosseae* y *G. etunicatum* desarrollan una mayor efectividad en el suelo A (donde son autóctonos) y en el C, pero su capacidad para aumentar el crecimiento de la planta en el suelo B es bastante escasa. La única especie de endófito que no presenta grandes diferencias en cuanto a efectividad en los tres suelos ensayados es *Glomus sp*. Se puede inferir, por tanto, que la eficacia de un hongo micorrizico endófito está muy condicionada por el tipo de suelo y sólo algunas especies como *Glomus sp*. con gran valencia ecológica se pueden considerar como indiferentes edáficas.



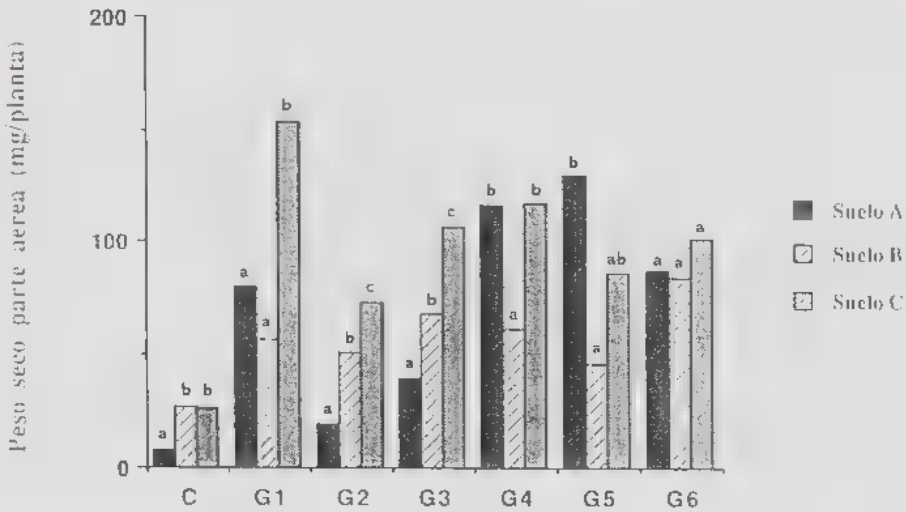


Fig. 1. - Peso seco de la parte aérea de *Anthyllis cytisoides* en los tres suelos ensayados para cada hongo micorrizico: C, control. G1, *G. fasciculatum*. G2, *G. epigaeum*. G3, *G. macrocarpum*. G4, *G. mosseae*. G5, *G. etunicatum*. G6, *Glomus* sp. Los valores representados en las columnas con la misma letra no difieren significativamente ( $p < 0.05$ ) según el test de Duncan.

Fig. 1 - Shoot dry weights of *Anthyllis cytisoides* in the three soil types, inoculated with: C, control. G1, *G. fasciculatum*. G2, *G. epigaeum*. G3, *G. macrocarpum*. G4, *G. mosseae*. G5, *G. etunicatum*. G6, *Glomus* sp. Values in a column with the same letter do not differ significantly ( $p < 0.05$ ) as determined by Duncan's test.

### Asimilación de fósforo

Aunque el contenido en P asimilable es marcadamente diferente en los tres suelos, este hecho parece no influir en la absorción de P en los controles, pues todos ellos presentaron concentraciones de este elemento en torno a las 450 ppm (Fig. 2). Cabría esperar que en el suelo C con mayor contenido en P los controles asimilaran este nutriente en mayor proporción. Sin embargo, *Anthyllis cytisoides* se ha revelado como una especie muy dependiente de la micorrización. En ausencia de hongo simbiote no sólo el desarrollo de la planta está seriamente limitado, sino también la absorción de nutrientes, aunque esta última premisa sólo se ha comprobado en el caso del fósforo.

Del mismo modo, las diferencias de P en el sustrato no parecen tampoco influir en las pautas de captación en los distintos suelos. No se aprecia como cabría esperar un mayor contenido en P en las plantas desarrolladas en el suelo C. En cambio, la absorción de este nutriente por parte de la planta parece estar en función del hongo ensayado. Sólo se han registrado diferencias para un mismo hongo en distintos suelos en el caso de *G. fasciculatum* y *G. mosseae*.

### CONCLUSION

De los resultados obtenidos se pone de manifiesto que las características del sustrato pueden influir decisivamente en el comportamiento de diferentes

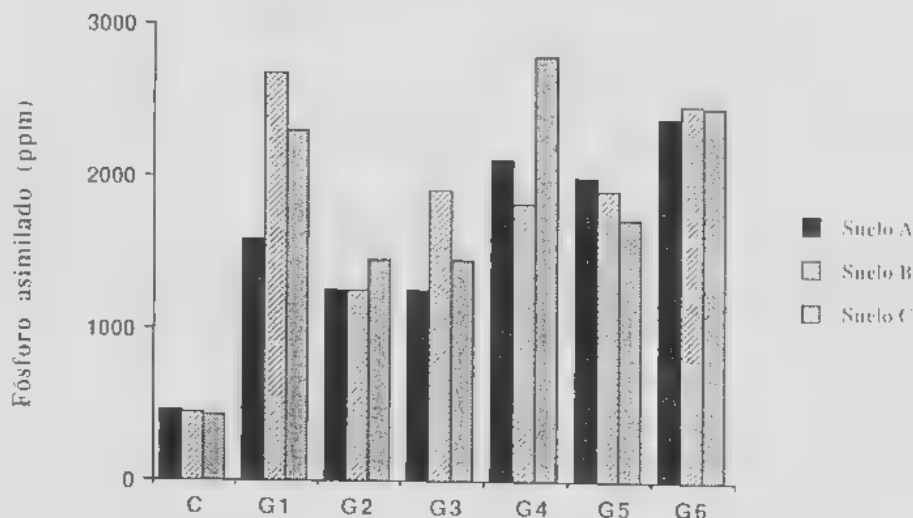


Fig. 2. - Fósforo asimilado por la parte aérea de *A. cytisoides* en los tres suelos ensayados para cada hongo micorrizico; C, control. G1, *G. fasciculatum*. G2, *G. epigaeum*. G3, *G. macrocarpum*. G4, *G. mosseae*. G5, *G. etunicatum*. G6, *Glomus* sp.

Fig. 2. - P. assimilated in shoot tissues of *A. cytisoides* in the three soil types, inoculated with: C, control, G1, *G. fasciculatum*. G2, *G. epigaeum*. G3, *G. macrocarpum*. G4, *G. mosseae*. G5, *G. etunicatum*. G6, *Glomus* sp.

endófitos VA, tanto en su capacidad de colonización de los sistemas radicales, como en su efectividad para incrementar el crecimiento y captación de P en la planta. Algunas características edáficas pueden influir, en condiciones naturales, en el comportamiento de los hongos en cuanto a producción de esporas y capacidad de infección. La producción de esporas se ha correlacionado positivamente con el contenido en materia orgánica (Nappi *et al.*, 1985) y nivel de humedad del suelo (Walker *et al.*, 1982) negativamente con la concentración de Na (Ho, 1987) y en forma variable con el pH (Seikh *et al.*, 1975; Ho, 1987). En cualquier caso no está claro cuál es el factor o factores determinantes, aunque parece más lógico que sea el conjunto de características diferenciales de un determinado suelo (Giovannetti, 1985). La imposibilidad de conseguir cultivos puros de hongos MVA impide en gran medida la realización de bioensayos conducentes a determinar factores intrínsecos de crecimiento y viabilidad para estos hongos.

Aunque no existe especificidad en la simbiosis hongo MVA-planta hospedante, puede haber una cierta compatibilidad para determinados binomios (Smith & Gianinazzi-Pearson, 1988). Esta compatibilidad puede además verse afectada por el tipo de sustrato, como se deduce el presente trabajo.

Parece evidente, con perspectivas a fines prácticos de aplicación en revegetación, la necesidad de llevar a cabo los ensayos de efectividad con hongos endomicorrizicos utilizando como sustrato experimental aquellos suelos posible objeto de recuperación.

## AGRADECIMIENTOS

Este trabajo forma parte del Programa LUCDEME (Proyecto 88 JW 855 A).

## BIBLIOGRAFIA

- ABBOTT L.K. and ROBSON D., 1982 - The role of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi in agriculture and the selection of fungi for inoculation. *Austral. J. Agric. Res.* 33: 389-408.
- AZIZ T. and HABTE M., 1990 - Enhancement of endomycorrhizal activity through nitrogen fertilization in cowpea grown in an oxisol subjected to simulated erosion. *Arid Soil Res. Rehab.* 4: 131-139.
- BAREA J.M., 1990 - Micorrizas vesículo arbusculares. In: CASADESUS J. y RUIZ-BERRAQUERO F., *Microbiología 1990*. Secretariado de Publicaciones de la Universidad de Sevilla: 271-278.
- BAREA J.M., SALAMANCA C.P., HERRERA M.A. y ROLDAN-FAJARDO B.E., 1990 - La simbiosis microbio-planta en el establecimiento de una cubierta vegetal sobre suelos degradados. In: ALBALADEJO J., STOCKING M.A. y DIAZ E., *Soil degradation and rehabilitation in Mediterranean environmental conditions*. Murcia, CSIC: 139-158.
- DEHNE H.W., 1982 - Interactions between vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi and plant pathogens. *Phytopathology* 72: 1115-1119.
- DUNCAN D., 1955 - Multiple range and multiple F-test. *Biometrics* 11: 1-42.
- FERNANDEZ J.A., NIELL F.X. and LUCENA J., 1985 - A rapid and sensitive automated determination of phosphate in natural waters. *Limnol. Oceanogr.* 30: 227-230.
- GIOVANNETTI M., 1985 - Seasonal variations of vesicular-arbuscular mycorrhizas and endogonaceous spores in a maritime sand dune. *Trans. Brit. Mycol. Soc.* 84: 679-684.
- GIOVANNETTI M. and MOSSE B., 1980 - An evaluation of techniques for measuring vesicular-arbuscular mycorrhizal infection in roots. *New Phytol.* 84: 489-500.
- HARLEY J.L. and SMITH S.H., 1983 - *Mycorrhizal Symbiosis*. London, Academic Press.
- HAYMAN D.S. and TAVARES S., 1985 - Plant growth responses to vesicular-arbuscular mycorrhiza. XV. Influence of soil pH on the symbiotic efficiency of different endophytes. *New Phytol.* 100: 367-377.
- HO I., 1987 - Vesicular-arbuscular mycorrhizae of halophytic grasses in the Alvord Desert of Oregon. *Northwest Sci.* 61: 148-151.
- IBRAHIM M.A., CAMPBELL W.F., RUPP L.A. and ALLEN E.B., 1990 - Effects of mycorrhizae on sorghum growth, photosynthesis, and stomatal conductance under drought conditions. *Arid Soil Res. Rehab.* 4: 99-107.
- JEFFRIES P., 1987 - Use of mycorrhizae in agriculture. *CRC Critical Reviews in Biotechnology* 5: 319-357.
- ILOI L. and GIOVANNETTI M., 1987 - Variable effectivity of three vesicular-arbuscular mycorrhizal endophytes in *Hedysarum coronarium* and *Medicago sativa*. *Biol. Fertil. Soils* 4: 193-197.
- NAPPI P. JODICE R., LUZZATI A. and CORINO L., 1985 - Grapevine root system and VA mycorrhizae in some soils of Piedmont (Italy). *Plant Soil* 85: 205-210.
- NELSEN C.E. and SAFIR G.R., 1981 - Increased drought resistance of mycorrhizal onion plants. *Phytopathology* 71: 896-897.

- PHILLIPS J.M. and HAYMAN D.S., 1970 - Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. *Trans. Brit. Mycol. Soc.* 55: 159-161.
- ROSKOSKI J.P., MONTANO J., VAN KESSEL C. and CASTILLEJA G., 1982 - Nitrogen fixation by tropical woody legumes: potential source of soil enrichment. In: GRAHAM P.H. and HARRIS S.C., *Biological nitrogen fixation technology for tropical agriculture*. Cali, Centro Internacional de Agricultura Tropical: 447-454.
- SEIKH N.A., SAIF S.R. and KHAN A.G., 1975 - Ecology of *Endogone*. II Relationships of *Endogone* spore population with chemical soil factors. *Islamabad J. Sci.* 2: 6-9.
- SMITH S.E. and GIANINAZZI-PEARSON V., 1988 - Physiological interactions between symbionts in vesicular-arbuscular mycorrhizal plants. *Annual Rev. Physiol., Pl. Mol. Biol.* 39: 221-244.
- SOIL SURVEY STAFF, 1975 - *Soil Taxonomy: a basic system of soil classification for making and interpreting soil surveys*. Soil Conservation Service. USDA. Handbook n° 436.
- SYLVIA D.M. and BURKS J.N., 1988 - Selection of a vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus for practical inoculation of *Untola paniculata*. *Mycologia* 80: 565-568.
- TRAPPE J.M., 1981 - Mycorrhizae and productivity of arid and semiarid rangelands. In: *Advances in food producing systems for arid and semiarid lands*. New York, Academic Press.
- WALKER C., MIZE C.W. and McNABB H.S., 1982 - Populations of endogonaceous fungi at two locations in Central Iowa. *Canad. J. Bot.* 60: 2518-2529.
- WILLIAMS S.E. and ALLEN M.F., 1985 - VA mycorrhizae and reclamation of arid and semi-arid lands. In: MOLINA R., *6th North American Conference on Mycorrhizae*. Corvallis, Oregon, Forest Res. Lab.: 249.

## MYCOLOGICAL EXSICCATA FROM BORNEO, COLLECTED BY ODOARDO BECCARI, KEPT IN THE HERBARIUM CESATIANUM (RO)

Laura ZUCCONI

Università della Tuscia, Facoltà di Scienze MMFFNN, Via San  
Camillo de Lellis, 01100 Viterbo, Italy.

**ABSTRACT** - The extensive mycological exsiccata collected by O. Beccari in Borneo and studied by V. Cesati is deposited in the Herbarium of the Dipartimento di Biologia Vegetale, Città Universitaria, Rome (RO). A complete list of these species is provided with an indication of their presence in the Cesati Herbarium.

**RÉSUMÉ** - Les nombreux exsiccata mycologiques récoltés à Bornéo par O. Beccari et étudiés par V. Cesati, sont déposés dans l'Herbier du département de Biologie végétale, cité universitaire, Rome (RO). On donne la liste complète de ces espèces avec indication de leur présence dans l'Herbier de Cesati.

**KEY WORDS** : Borneo, fungi, O. Beccari, V. Cesati, herbarium.

A study of the mycological section of the Herbarium of Vincenzo Cesati (1806-1883), preserved at the Herbarium of the Dipartimento di Biologia Vegetale, Città Universitaria, Rome (RO) (Zucconi, 1989), enabled the location of a considerable amount of mycological exsiccata that Odoardo Beccari (1843-1920) collected in the South-Eastern Asia and presented to Cesati for study. The uniqueness of the exsiccata present in the Herbarium of Rome has been confirmed by a visit at the Herbarium Universitatis Florentinae (FI), where the whole Beccari collection is kept. In 1879 this mycological material appeared in a Cesati work entitled *Mycetum in itinere Borneensi Lectorum a Cl. Od. Beccari Enumeratio*.

The label of each specimen presents the name of the collector, the place of collection, the determination and, though not always, the date of the collection. There are often some original drawings, descriptions and notes handwritten by Cesati.

In the present paper are reported, following the order of publication, all the species studied by Cesati and for each one, the presence or absence of the relative specimen in the Herbarium is indicated. The presence of the specimens with more than one determination is indicated as uncertain. Finally, those specimens studied and indicated as types by scholars are also pointed out. This material has not been the subject, in this work, of any systematic and taxonomic investigation.

In the Cesati publication there are reported three new genera and more than 300 species, with numerous varieties; the three new genera and many of the new species described are found in the Herbarium.

The aim of this work is to inform taxonomists about the presence or absence of some specimens, making the search easier and promoting their study.

## MYCETUM IN ITINERE BORNEENSI LECTORUM A CL. OD. BECCARI ENUMERATIO

### HYMENOMYCETES

- Agaricus (Tricholoma) sub-gambosus* Nob. / Absent  
*A. (Clitopilus?) orcellarius* Nob. / Absent  
*A. (Pleurotus) semisupinus* Berk. & Br. / Present  
*A. (Omphalia) micromeles* Berk. & Br. / Present  
*A. (Flammula) paupercula* Nob. & S3 Present  
*A. (Naucoria) myosotis* Fr. / Absent  
*A. (Crepidotus) mollis* Schaeff. / Present  
*A. (Crepidotus) proteus* Kalchbr. / Absent  
*A. (Crepidotus) flavomarginatus* Berk. & Br. / Present  
*A. (Crepidotus) pezizula* Berk. & Br. / Absent  
*A. (Panaeolus) papilionaceus* Bull. ? / Absent  
*Marasmius (Collybia) oreades* Fr. ? / Absent  
*M. (Mycena) galericula* Nob. / Present  
*M. (Mycena) arachnoideus* B. & C. / Present  
**ANTHRACOPHYLLUM** Nob. n. gen.  
*A. beccarianum* Nob. / Present / holotype (Pegler & Young, 1989)  
*Hellomyces pauciradiatus* Nob. / Absent  
*Cantharellus bicolor* Nob. / Present  
*Panus copulatus* Ehrbg. / Present  
*Lentinus dactylophorus* Lév. / Present  
*L. glandulosus* Nob. / Present  
*L. beccarianus* Nob. / Present  
*L. setiger* Lév. / Present  
*L. leucochrous* Lév. / Present  
*Xeroneus ? dasypus* Nob. / Present  
*Lenzites brunneola* Berk. / Present  
*L. repanda* Fr. / Absent  
*Boletus (Viscipellis) longicollis* Nob. / Absent  
*B. (Viscipellis) subimentosus* L. ? / Absent  
*B. (Calopus Recedens) mandarinus* Nob. / Absent  
*Polyporus (Pleuropus) amboinensis* Fr. / Present  
*P. (Pleuropus) mastoporus* Lév. / Present  
*P. (Pleuropus) lingua* Nees / Present  
*P. (Pleuropus) beccarianus* Nob. / Absent  
*P. (Pleuropus) rhipidius* Berk. / Uncertain  
*P. (Pleuropus) eriopus* Nob. / Absent  
*P. (Pleuropus) polychrous* Nob.  
 I. Forma mesopoda / Present  
 II. Forma pleuropoda  
 1. var. *rufo-aurata* / Present  
 2. var. *pallida* / Present  
*P. (Pleuropus) flabelliformis* Klotsch / Present; var. *glabrata concolor* / Present  
*P. (Pleuropus) grammacephalus* Berk. / Present; cum varietate fusciscenti, attenuata, petalode / Uncertain  
*P. (Pleuropus) incompletus* Nob. / Present  
*P. (Pleuropus) squamaeformis* Berk. / Present  
*P. (Placodermeus) piceus* Nob. / Absent  
*P. (Placodermeus) unguatus* Bull. / Absent  
*P. (Placodermeus) fulvus* Fr. / Absent

- P. (Placodermeus) rufo-flavus* B. & C. / Present  
*P. (Placodermeus) semitostus* Berk. Forma resupinata / Present  
*P. (Placodermeus) bubidus* Berk. ? / Absent  
*P. (Placodermeus) aurora* Nob. / Present  
*P. (Placodermeus) cremorinus* Nob. / Present  
*P. (Placodermeus) caliginosus* Nob. / Present  
*P. (Placodermeus) pusiohus* Nob. / Present  
*P. (Placodermeus) sanguinarius* Kl. / Present  
*P. (Placodermeus) melanoporoides* Nob. / Absent  
*P. (Placodermeus) zonalis* Berk. forma resupinata / Present  
*P. (Placodermeus) crociinctus* B. & C. / Present  
*P. (Inodermeus) caestellus* Nob. / Absent  
*P. (Inodermeus) dermatodes* Lév. / Present  
*P. (Inodermeus) zonatus* Fr. / Present / cum var. *pygmaea* / Present  
*P. (Inodermeus) confundens* Nob. / Uncertain  
*P. (Inodermeus) paradeniae* B. & Br.! / Absent  
*P. (Inodermeus) bivalvis* Pers. / Present  
*P. (Inodermeus) personatus* B. & Br.! / Present  
*P. (Inodermeus) vilis* Nob. / Present  
*P. (Inodermeus) hirsutus* Fr. / Present  
*P. (Inodermeus) velutinus* Fr. / Absent  
*P. (Inodermeus) masskarlii* Lév. / Absent  
*P. (Resupinatus) ravenalae* B. & Br. / Present  
*P. (Resupinatus) luctuosus* Nob. / Present  
*P. (Resupinatus) cinerascens* Schw. / Present  
*P. (Resupinatus) sarawacensis* Berk. / Present  
*Daedalea lenziformis* Nob. / Absent  
*D. platypoda* Lév. ? / Absent  
*D. sanguinea* Kl. / Present  
*D. imponens* Nob. / Present / holotype (Parmasto, 1983)  
*D. pruinoso* Lév. / Present  
*D. ? velutina* Nob. / Present  
*Trametes colliculosa* Berk. / Absent  
*T. ludificans* Nob. / Present  
*T. versatilis* Berk. / Present  
*Hexagonia subaculeata* Nob. / Present  
*H. polygramma* Mont. / Present  
*H. vitellina* Nob. / Present  
*H. cesatii* Berk. / Present  
*Favolus (Mesopus) cillario* Mont. / Present  
*F. (Pleuropus) tessellatus* Mont. / Present  
*F. (Pleuropus) scaber* Berk. / Present / var. *fusca* Nob. / Present  
*F. (Pleuropus) scaber* Berk. var. *caespitosa* / Absent  
*F. (Apus) papulosus* Nob. / Present  
*F. (Apus) auriculaeformis* Nob. / Absent  
*F. (Apus) cucullatus* Mont. / Present  
*F. (Apus) transiens* Nob. / Present  
*Cyclomyces beccarianus* Nob. / Present  
*Laschia lurida* Nob. / Present  
*Merulius similis* B. & Br. ? / Present  
*M. crocicreas* Nob. / Present  
*Hydnum (Mesopus) ferrugineum* Fr. / Present  
*H. (Apus) ravakense* Pers. / Present  
*H. (Resupinatum) glabrescens* Berk. & Rav. ? / Present  
*H. (Resupinatum) cesatii* Berk. / Present  
*Irpex (Resupinatus) depauperatus* B. & Br. / Uncertain  
*Grandinia crustosa* Pers. / Present  
*G. (Apus) glabrescens* B. & Rav. / Absent  
*Odonia ? farinacea* Nob. / Present  
*Radulum mirabile* B. & Br. ? / Absent  
 BECCARIELLA Nob. n. gen.  
*B. insignis* Nob. / Present

- Cladoderris dendritica* (Pers.) Berk. / Present  
*Craterellus spathularius* Berk. & Curtis / Absent  
*C. cornucopioides* Pers. / Present  
*C. hypolyssoides* Nob. / Present  
*Telephora multipartita* Fr. / var. *fuscella* - Present / var. *soluta* - Present / var. *isarioides*,  
*sterilis* - Absent  
*Stereum (Mesopus) spathulatum* Berk. / Present  
*S. (Apus) berkeleyanum* Nob. / Absent  
*S. (Apus) rubiginosum* Fr. / Uncertain  
*S. (Apus) ochraceo-flavum* Ellis / Absent  
*S. (Apus) ochroleucum* Fr. / Present  
*S. (Apus) ferrugineum* Fr. ? / Present  
*Auricularia sordescens* Nob. / Present  
*Auricularia* <sup>8</sup> An *A. lobata* Sommf. ? / Absent  
*Hymenochaete depallens* B. & Br. / Present  
*Corticium (Himantia) lacteum* Fr. / Absent  
*C. berkeleyanum* Nob. / Absent  
*C. peradeniae* B. & Br. / Present  
*Hypochnus ruberrimus* Nob. / Present  
*Guepina spathularia* Fr. / Present  
*G. fissa* Berk. / Absent  
*G. palmiceps* Berk. Ic. / Present  
*Guepina* sp. n. ? / Present  
*Clavaria intricata* Nob. / Present  
*C. thwaitesii* Berk. & Br. / Present  
*Hirneola hispidula* Berk. / Present  
*Dacrymyces varius* Nob. / Present  
**DISCOMYCETES**  
*Peziza (Discina) sarmentorum* B. & Br. / Present  
*P. (Geopyxis) hindsii* Berk. var. *beccariana* Nob. / Absent  
*P. (Geopyxis) crocina* Mont. / Absent  
*P. (Helotium) lenticularis* Bull. / Absent  
*P. (Helotium) epiphylla* Pers. / Absent  
*P. (Niptera) cinerea* Batsch. / Absent  
*P. (Dasyscypha) simillima* B. & Br. / Present  
*Helotium agaricicola* ■. & Br. ? / Absent  
*Cyphella scariosa* Nob. / Absent  
*Ascobolus leiocarpus* B. & Br. / Present  
*Ascobolus* sp. / Absent  
*A. cenangioides* Nob. / Absent  
*Patellaria ? Tympanis?* / Absent  
*Tympanis vermicularis* Nob. / Present  
**GASTEROMYCETES**  
*Hymenophallus indianus* Cda. / Present  
*H. roseus* Nob. / Absent  
*Mutinus ? borneensis* Nob. / Absent  
*Splanchnomyces luteus* Cda. & S3 Present  
*Cyathus byssisedus* (Jungh.) Tul. / Present  
*Tulostoma pusillum* Berk. ? / Present  
*Lycoperdon pusillum* Bull. / Absent  
*L. scrobiculatum* Nob. / Present  
*Scleroderma columnare* B. & Br. / Absent  
*S. anomalum* Nob. / Absent  
*Stegasma pallidum* Nob. / Present  
*Geaster minimus* Schw. / Absent  
*Hussea insignis* Berk. / Present  
*H. pachystelis* Nob. / Absent  
*Mitromyces junghuhnii* Schldl. & Müll. / Present  
*Trichocoma paradoxum* Jungh. / Present  
*Lycogala ?* / Absent  
*Arcyria punicea* Pers. / Present  
*Enteromyxa cerebrina* Nob. / Present



## PHACIDIACEI

*Phacidium dentatum* Fr. / Present*Hypoderma pusillum* Nob. / Present*Lophodermium* sp. / Absent*Angelina beccariana* Nob. & S3 Present*Hysterium serpens* Nob. / Present*H. berkeleyanum* Nob. / Present*Aylographum vagum* Lib. / Present*A. spilomoide* Nob. / Present

## PYRENOMYCETES

*Torrubia myrmecophila* (Ces.) Tul. / Absent*T. gentilis* Nob. / Present*T. ophioglossoides* (Ehrh.) Tul. / Present*T. barnesii* (Thw.) Nob. / Present*T. adpropingans* Nob. / Absent*T. militaris* (Fl. Dan.) Tul. / Absent*Hypocrea rhytidospora* Nob. / Present*H. gelatinosa* cum var. *umbrina* Fr. / Uncertain*H. rufa* Fr. / Present*H. scutula* Cooke / Present*Poronia oedipus* Mont. / Present*Sphaerostilbe incerta* Nob. / Present / holotype (Seifert, 1985)*Nectria tabacina* Nob. / Present*N. haematococca* B. & Br. ? / Absent*N. cinnabarina* Fr. / Present*N. sanguinea* Fr. ? / Present*N. myriadea* Nob. / Absent*N. coccinea* Fr. / Present*Xylaria massula* Nob. / Present*X. rhizomorpha* Mont. / Present*X. acicula* Nob. / Present*X. aristata* Mont. / Present*X. phyllophyla* Nob. / Absent*Xylaria* An *A. Phyllocharris* Mont. ? / Present*X. axifera* Mont. ? / Present*X. dichotoma* Kze. / Present*X. caespitulosus* Nob. / Present*X. scopiformis* (Kze) Fr. var. *ellator* / Present*X. rhizocola* Mont. / Absent*X. exalbata* B. & Br. / Present*X. gigantea* (Zipp. mss. Lev.) Nob. / Present*X. allantoidea* Berk. / Present*X. intermedia* Nob. / Present*X. plebeja* Nob. / Absent*X. complanata* Nob. / Present*X. hypoxylon* var. *mucronata* Berk. ? / Present*X. polymorpha* Grev. / Present*X. fissilis* Nob. / Present*X. rhopaloides* (Mont.) Berk. ! / Present*X. gardneri* Berk. / Present*X. melanaxis* Nob. / Present*X. guepini* Fr. / Present*X. corniformis* Fr. / Present*X. cupressiformis* Fr. / Present*Hypoxylon chalybaeum* Berk.! a) *typica* b) *congesta* c) *minor* / Uncertain*H. microsporum* Nob. / Present*H. pseudo-tubulina* Nob. / Present*H. marginatum* Schw. / Present*H. stigmatoides* Nob. / Present*H. glebulosum* Nob. / Present*H. serpens* Fr. / Present*H. approximans* Nob. / Present

- H. avellana* Nob. / Present  
*H. fragaria* Nob. / Present  
*H. coenopus* Fr. cum var. *apoda* Berk. / Present  
*H. pavimentosum* Nob. / Present  
*H. pauxillum* Nob. / Present  
*H. clavus* Fr. / Present  
*H. micropus* Fr. / Present  
*H. deustum* Fr. / Present  
*H. cohaerens* Fr. var. *tenuior* / Absent  
*H. coelatum* Fr. / Present  
*H. macrocenangium* Nob. / Present / holotypus (Nannfeldt, 1972)  
*H. comedens* Nob. / Present  
*H. udum* Fr. / Present  
*H. deciduum* B. & Br. / Present  
*H. tormentosum* Nob. / Present  
*H. pithodes* Berk. / Present  
*H. anthracodes* Mont. / Uncertain  
*H. ? gangraena* Nob. / Present  
*Hypomyces chromaticus* Berk. ? / Absent  
*Valsa ceratophora* Tul. ? / Uncertain  
*V. assimilis* Nob. / Present  
*Melogramma cinnamomi* Nob. / Present  
*Cucurbitaria insularis* Nob. / Present  
*Aglaospora beccariana* Nob. / Present  
*Sphaeria beccariana* Nob. / Present  
*S. scabiens* Nob. / Absent  
*S. leveillei* Mont. ? / Absent  
*S. bombardella* Nob. / Present  
*S. alvear* Nob. / Present  
*S. macrostomella* Nob. / Present  
*S. arundinacea* Sow. / Present  
*S. sarawacensis* Nob. / Present  
*S. regulina* B. & Br. ? / Present  
*S. tingens* Nob. / Present  
*Amphisphaeria beccariana* Nob. / Present  
*A. enteroxantha* Nob. / Absent  
*Gibbera borneensis* Nob. / Present  
*Bombardia bertloides* Nob. / Present  
*Rosellinia nitens* Nob. / Absent  
*R. spadicea* Nob. / Present  
*R. hypoxylina* Nob. / Present  
*R. mammaeformis* CD.ris ? / Present  
*R. ignobilis* Nob. / Absent  
*R. beccariana* Nob. / Present  
*Sordaria pachydermatica* Nob. / Present  
*S. microspora* Nob. / Present  
*S. grisea* Nob. / Present / holotypus: from a revision of Lundqvist, in 1977, reported on the label  
*S. sarawacensis* Nob. / Present / lectotypus: from a revision of Lundqvist, in 1977, reported on the label  
*S. punctiformis* Nob. / Present / type: from a revision of Lundqvist, in 1977, reported on the label  
*S. caulicola* Nob. / Present  
*S. oblectans* Nob. / Present  
*Rhaphidospora exilis* Nob. / Present  
*R. hystrix* Nob. / Present  
*Sphaerella plegmariae* Nob. / Present  
*Sphaeropsis undulata* B. & C. ? forma *pycnidica* ? / Present  
*Dothidea oceanica* Nob. / Present  
*D. phaselina* Berk. / Present  
*D. graminis* Fr. ? / Present  
*D. membranacea* Nob. / Present

- D. hysteriodes* Nob. / Present  
*Sporormia minima* Awd. / Present  
*Diplodia radula* B. & Br. / Present  
*Sphaeronema ? aurantiacum* Nob. / Present  
*Phoma orchidearum* Nob. / Absent  
*P. arundinaceum* Nob. / Absent  
*P. aequivocum* Nob. / Absent  
*Discosia (incerta)* / Absent  
*Meliola triseptata* B. & Br. ? / Absent  
*M. amphitriche* Fr. ? / Uncertain  
*Rhytisma pongamiae* B. & Br. / Present / cum varietate peritheciis dispersis / Present  
*R. berkeleyanum* Nob. / Present  
*Melanconium melanoxanthum* B. & Br. / Present / var. *major* / Present  
*Pemphidium coffeinum* Nob. / Present

## HYPHOMYCETES

- Stilbum graphioideum* B. & Br. ? / Present  
*S. clavulatum* Nob. / Absent  
*Arthrobotryon beccarianum* Nob. / Present  
*Cladosporium occultum* Nob. / Present  
*Helminthosporium decorum* Nob. / Present  
*Chloridium ? lunulatum* Nob. / Present  
*C. ? microsporium* Nob. / Absent  
*Merosporium velutinum* Nob. / Present  
*Sporidesmium erineoides* Nob. / Present  
*S. cirrhatum* Nob. / Present

## CONIOMYCETES

- Aecidium sarawacense* Nob. / Present  
*A. fragiforme* Nob. / Absent  
*Ceratitium phacosporum* Nob. / Absent  
*Ustilago endotracha* Berk. / Present  
*U. leucoderma* Berk. / Present

## APPENDIX

- XEROMYCES* Nob. (Gen. nov.)  
*X. ochraceus* Nob. / Present / holotype: from a revision of *Bresadola*, in 1910, reported on the label  
*Sclerotium glumale* Nob. / Absent  
*S. lingulatum* Nob. / Present  
*S. hypocreomorphum* Nob. / Present  
*S. rhachidophilum* Nob. / Present  
*S. enterophaeum* Nob. / Present

\*

\*   \*   \*

## Other species not listed by Cesati:

- Grammothele mappa* B. & C. ?  
*Gymnosporium circumscissum* B. & Br.  
*Hypocrea citrina* Fr.  
*Nectria* sp.  
*Polyporus sanguineo-marginate* Ces.  
*Xylaria rudis* Ces.  
*X. tabacina* Berk.  
*Xylaria* sp.

## ACKNOWLEDGEMENTS

The author wishes to thank Palmer Marchi (Rome) for advice he provided on carrying out the research.

## REFERENCES

- CESATI V., 1879 - Mycetum in itinere Borncensi lectorum a Cl. Od. Beccari enumeratio. *Atti della Reale Accademia delle Scienze Fisiche e Matematiche di Napoli* 8: 1-28, figs 1-4.
- NANNFELDT J.A., 1972 - *Camarops* Karst. (Sphaeriales-Boliniaceae). With Special regard to its European Species. *Svensk Bot. Tidskr.* 66: 364.
- PARMASTO E., 1983 - *Gloeophyllum imponens* (Aphylophorales). *Mycotaxon* 18: 53-56.
- PEGLER D.N. and YOUNG T.W.K., 1989 - The genus *Anthracoephyllum* (Tricholomataceae Tribe Collybieae). *Mycol. Res.* 93: 352-362.
- SEIFERT K.A., 1985 - A monograph of *Stilbella* and some allied Hyphomycetes. *Stud. Mycol.* 27: 118.
- ZUCCONI L., 1989 - The mycological section of the Herbarium Cesatianum of Rome (RO) - Collections and Collectors. *Ann. Bot. (Roma)* 47: 175-188.

## TRETOCEPHALA DECIDUA GEN. ET SP. NOV., AN INTERESTING NEW HYPHOMYCETE

C.V. SUBRAMANIAN

Central Institute of Medicinal and Aromatic Plants,  
Post Bag N° 1, P.O. RSM Nagar, Lucknow-226016 India.

**ABSTRACT** - An interesting dematiaceous hyphomycete collected on *Oncosperma horridum* Scheff. (Palmae) from Singapore is described. It is unique in producing solitary, one-celled lenticular conidia with a longitudinal germ slit from terminal, polytretric conidiogenous cells on simple conidiophores. Its taxonomy is discussed. It is placed in a new genus, *Tretocephala*, as a new species, *T. decidua*.

**RÉSUMÉ** - Description d'un nouvel Hyphomycète récolté sur *Oncosperma horridum* Scheff. (Palmaceae) à Singapour. Il est original par la production de conidies solitaires, unicellulaires, lenticulaires avec une fente germinative longitudinale, formées à partir de cellules conidiogènes polytrétiques, sur des conidiophores simples. La taxonomie est discutée et un nouveau genre est proposé: *Tretocephala* avec une espèce nouvelle: *T. decidua*.

**KEY WORDS** : Hyphomycete, taxonomy, *Tretocephala*.

### INTRODUCTION

As part of the author's continuing programme of work on tropical microfungi, the author has been studying his collections from Singapore made during his stay there at the National University during 1986-1987. An interesting new dematiaceous hyphomycete was collected on *Oncosperma horridum*. This paper deals with the description of this fungus and its taxonomy.

### DESCRIPTION OF THE FUNGUS

The mycelium is superficial and is composed of thin, brown, septate, highly and reticulately branched hyphae 1.5-3.0  $\mu\text{m}$  wide, forming a plectenchymatous mat from which conidiophores arise in crowded clusters. The conidiophores are mononematous, simple, erect, straight or flexuous, brown, thick-walled except towards the apex where it is wider and paler, widest in the apical part which is broadly rounded or clavate, several-septate but faintly or thinly so, with the apical cell fertile and polytretric (Fig. 4 and 5), often proliferating percurrently to produce another fertile apex, (130-) 150-260-(310)  $\times$  3-4  $\mu\text{m}$ ; the apical cell is 3.7-5.3  $\mu\text{m}$  wide. The conidia are solitary, one-celled, dark brown, thick-walled, lenticular and with longitudinal germ slit (Fig. 8), obovate and narrowing to a point at the base, with a distinct hilum at the pointed base, dry, typically deciduous so that clusters of conidia and the polytretric nature of conid-

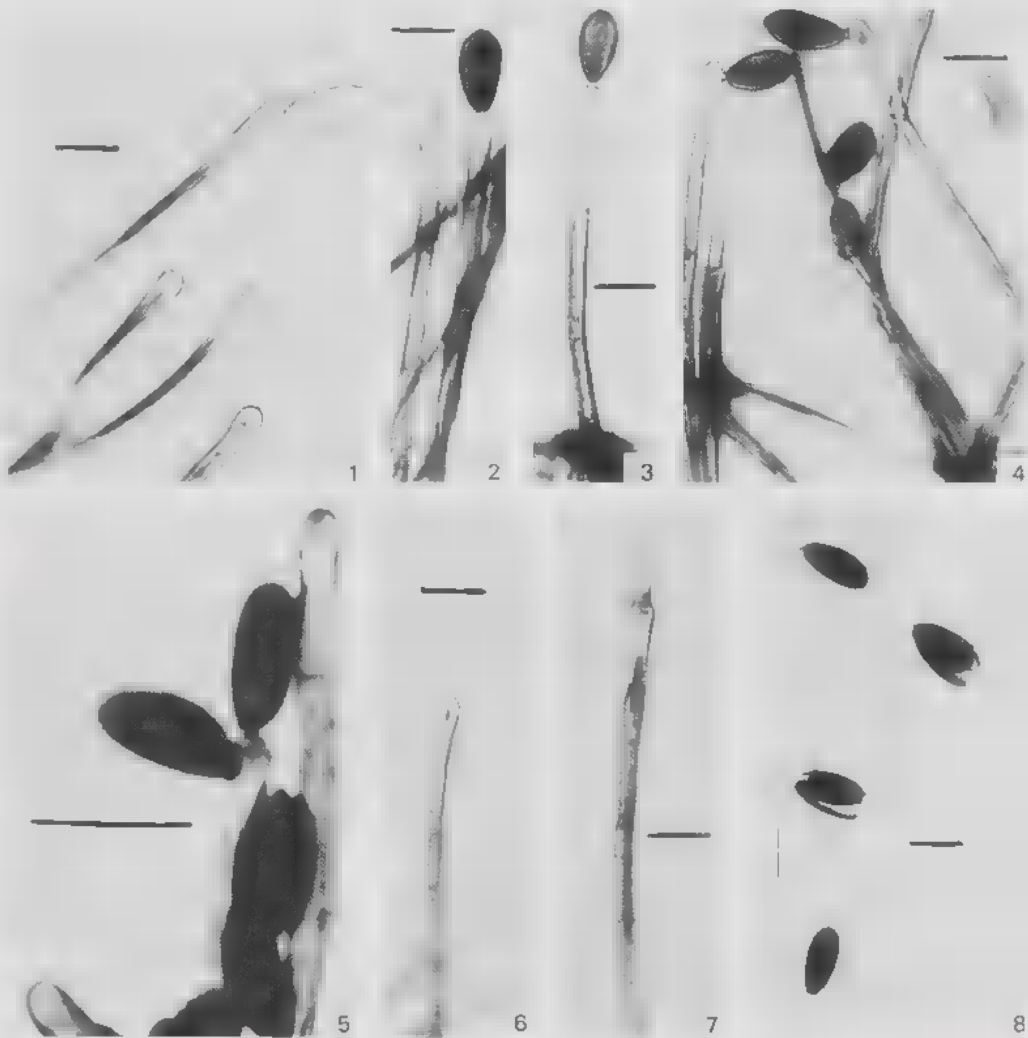


Fig. 1-8. *Tretocephala decidua* ex Type S 60. 1-5: Conidiophores and tretic conidia still attached. Note the polytretic nature of the conidiogenous cell in fig. 4 and 5. Note also the mature lenticular conidia with longitudinal slit. 6: distal part of young conidiophore. 7: conidiophore showing percurrent proliferation. 8: conidia, two of which show splitting along the longitudinal slit in 2 halves. Bar connotes 10 $\mu$ m.

Fig. 1-8: *Tretocephala decidua*. 1-5: conidiophores avec trétoconidies encore attachées. On notera la nature polytrétique de la cellule conidiogène sur les figures 4 et 5 et la fente longitudinale des conidies mûres. 6: partie distale d'un jeune conidiophore. 7: conidiophore avec proliférations percurrentes. 8: conidies dont deux sont clivées longitudinalement le long de la fente. Echelle = 10 $\mu$ m.

igenous cells are not easily discerned. It is only by careful and critical observation that it has been possible to confirm the polytretic nature of the conidiogenous cell. The conidia are 12-17 $\mu$ m long, 5-8 $\mu$ m wide; the basal conidial hilum is 1.5-2.3 $\mu$ m wide.

This is an interesting hyphomycete. Its unique features are, of course, the simple septate conidiophores, the distinctive terminal conidiogenous cell which is polytretic, and the dry, deciduous one-celled lenticular conidia with longitudinal slit. Both *Diplococcium* Grove and *Spadicoides* Hughes which produce tretic conidia invite comparison with the present fungus. In both these genera not only the apical but other cells of the conidiophore are fertile. Additionally, in *Diplococcium*, the conidia form acropetal chains. Moreover, the lenticular conidia with longitudinal germ slit of the present fungus are unique. Such conidia are known in several hyphomycetes, but none, as far as the author is aware, in any taxon with tretic conidiogenesis.

A new genus *Tretiocephala* is proposed to take in the present fungus which is itself disposed as a new species, *T. decidua* thereof. The generic name is suggestive of the tretic cluster of conidia on the apical conidiogenous cell; the specific epithet connotes the highly deciduous nature of the conidia.

**TRETIOCEPHALA** Subramanian anamorph gen. nov.

Dematiaceous hyphomycete producing tretic conidia. Conidiophores simple, brown, septate, with apical cell conidiogenous, sometimes proliferating percurrently. Conidiogenous cell polytretic in the distal region. Conidia solitary, 1-celled, dark-coloured, lenticular with longitudinal germ slit, mamillate at base, deciduous, dry.

*Hyphomycete dematiaceae conidia tretica producentes. Conidiophora simplicia, fusca, septata, cum cellula conidiogena. Cellula conidiogena polytretica versus apicem. Conidia solitaria, unicellula, fuscoatra, lenticularia cum fissura longitudinalis, mamillata ad basim, decidua, sicca.*

Species typica:

*Tretiocephala decidua* Subramanian sp. nov.

***Tretiocephala decidua*** Subramanian sp. nov.

Colonies effuse, black, powdery. Mycelium composed of thin, brown, septate, highly and reticulately branched hyphae 1.5-3.0 $\mu$ m wide, forming a plectenchymatous mat from which conidiophores arise in crowded clusters. Conidiophores mononematous, simple, erect, straight or flexuous, brown, thick-walled except towards the apex where it is wider and paler, widest in the apical part which is broadly rounded or clavate, several-septate but faintly or thinly, with the apical cell fertile and polytretic, often proliferating percurrently to produce another fertile apex, (130)-150-260-(310) $\mu$ m long, 3-4 $\mu$ m wide; the apical cell 3.7-5.3 $\mu$ m wide. Conidia solitary, one-celled, dark brown, thick-walled, lenticular with longitudinal germ slit, obovate and narrowing to a point at the base, with a distinct hilum at the pointed base, dry and deciduous, 12-17 $\mu$ m long, 5-8 $\mu$ m wide.

Type: on leaf sheath and rachis of *Oncosperma horridum* Scheff. (Palmae) Botanical Garden, Singapore, Coll. C.V. Subramanian, 19. 11. 1987 (N<sup>o</sup> S 60).

*Coloniae effusae, nigrae, pulverulentae. Mycelium ex hyphis tenuis, fuscis, septatis, ramosis 1.5-3.0 $\mu$ m latis compositum. Conidiophora caespitosa, mononemata, simplicia, erecta, recta vel flexa, fusca, crassitunicata, latiore, late rotundata vel clavata ad apicem, tenuiter vel obscure multiseptata, cum cellula apicalis conidiogena, subinde proliferata percurrentes et producta aliae cellula conidiogena, (130)-150-260-(310) $\mu$ m longa, 3-4 $\mu$ m lata; cellula apicali 3.7-5.3 $\mu$ m lata. Conidia solitaria, unicellula, atro-fusca, crassitunicata, lenticularia cum fissura longitudinalis, obovata, mamillata vel mucronata ad basim, decidua, sicca, 12-17 $\mu$ m longa, 5-8 $\mu$ m lata.*

*Typus lectus in rachidii folii Onchospermae horridae Scheff. (Palmae), hortus botanicus, Singapore, leg. C.V. Subramanian, 19.ii.1987. sub numero S 60.*



## ANALYSES BIBLIOGRAPHIQUES

STRULLU D.G. (coordin.), 1991 - Les mycorhizes des arbres et plantes cultivées. Paris, Technique et Documentation, Lavoisier, 250 p.

Cet ouvrage est le résultat de la collaboration d'un Professeur d'Université (D.G. Strullu d'Angers) et de trois chercheurs de l'I.N.R.A. (R. Perrin et C. Plenchette de Dijon, J. Garbaye de Seichamps).

Par définition, les mycorhizes constituent un type de symbiose dans laquelle un champignon vit en association avec les racines d'une plante. Or, 95 p. cent des plantes sont concernées par un tel mode de vie. L'essor des biotechnologies qui banalise l'exploitation industrielle des micro-organismes d'une part et le développement pratique de la micropropagation des plantes cultivées d'autre part ont eu pour conséquence l'expansion des recherches concernant la maîtrise du clonage et de l'enracinement de la plante, mais aussi l'amélioration de la culture *in vitro* des champignons mycorhiziens; il en est résulté une meilleure connaissance des conditions de développement et de constitution de la symbiose entre les deux partenaires. Divers modèles de fonctionnement des symbioses mycorhiziennes sont ainsi proposés et analysés.

Les mycorhizes peuvent-elles être utiles comme moyen de lutte biologique? Attendre d'elles une éradication des maladies serait illusoire; on peut cependant, semble-t-il, grâce à elles, espérer atténuer certains effets pathologiques liés à des parasites d'origine tellurique.

L'amélioration génétique des cultures permet des accroissements substantiels de rendement. Mais l'inoculation de mycorhizes a, dans bien des cas, eu un effet stimulant sur la croissance et le développement des plantes, grâce à une action sur la nutrition phosphatée et une régulation de l'absorption de l'eau. C'est surtout en sylviculture qu'est envisagée une large application: une mycorhization par ectomycorhizes semble apporter en pépinière un incontestable effet bénéfique: les différents aspects de cette pratique, encore récente, sont examinés; malgré un coût qui peut paraître élevé pour certains, on note une nette amélioration de la qualité et de la taille des plants, ce qui peut éventuellement raccourcir la durée de la culture.

Illustré de schémas très clairs, avec une bibliographie bien fournie, ce livre constitue à la fois une mise au point des travaux récents et une ouverture sur un sujet passionnant, utile aux praticiens avisés autant qu'aux enseignants d'agronomie et qui ne manquera pas de susciter dans l'avenir l'extension d'un vaste domaine de recherches pleines d'intérêt.

C. Moreau

OLIVIER J.M., LABORDE J., GUINBERTEAU J., POITOU N. et HOUDEAU G., 1991 - La culture des champignons. Paris, Armand Colin éd., 160 p. ISBN 2-200-37242-6.

Après un bref rappel historique, les Auteurs donnent un aperçu des principales exigences des champignons (mode de vie, habitat, besoins nutritifs, influence des facteurs climatiques...) indispensables à connaître pour assurer la réalisation de leur culture.

Parmi les espèces présentées, le Champignon de couche, les Pleurotes lignicoles, le Shiitaké, occupent une place prépondérante et, pour chacune, les principales étapes de leur culture (choix et préparation du substrat, ensemencement, incubation, conditions requises pour la fructification, ennemis, installations nécessaires, rentabilité...) sont décrites.

Quelques pages sont consacrées au Pied-bleu (*Lepista nuda*), au Coprin chevelu (*Coprinus comatus*) et au Strophaire (*Stropharia rugoso annulata*), espèces dont la production n'est pas encore considérée par les Auteurs comme tout à fait "rodée". Les Morilles ne sont citées que pour mémoire, selon les Auteurs "il n'existe aucune méthode fiable de leur culture".

Au chapitre des champignons mycorhiziques, les Truffes sont l'occasion d'un bilan instructif des connaissances acquises ces dernières années, de leur mise en pratique, et des recherches destinées à améliorer la production.

A propos des Bolets (*Suillus granulatus* et *S. luteus*) et des Lactaires (*Lactarius deliciosus*), les Auteurs font état des résultats expérimentaux obtenus à la station INRA de Bordeaux et des perspectives de leur application.

Sous forme d'Annexes, suivent ensuite: un court exposé de la place des champignons cultivés dans la classification, un lexique des principaux termes utilisés dans l'ouvrage, un aperçu des règles à observer pour la commercialisation des champignons cultivés, quelques chiffres sur leur production et leur consommation, leur intérêt en alimentation humaine, une bibliographie pratique et une liste de quelques adresses utiles à ceux que le sujet intéresserait (Institut de recherches et techniques, organismes professionnels et administratifs, producteurs de semence et de substrat, industries spécialisées dans le matériel de culture).

De taille relativement modeste, ce livre présente pourtant une excellente mise au point, sans complaisances, du sujet, exposée en termes clairs accompagnés de schémas et de tableaux, où se retrouve toujours le souci d'informer, et de mettre en garde avec réalisme, les futurs amateurs de culture de champignons, surtout s'ils envisagent d'en faire une activité de rapport: pour les autres, il constitue une très bonne source de documentation sur le sujet.

R. Cailleux

BATRA L.R., 1991 - World species of *Monilinia* (Fungi): Their Ecology, Biosystematics and Control. Berlin, Stuttgart, J. Cramer in der Gebrüder  
ISBN 3-443-7600 6-6, DM 148.

Cette monographie du genre *Monilinia*, où la délimitation des espèces est faite par l'étude de la biologie, de la morphologie et des cultures sous conditions contrôlées était attendue depuis longtemps. Trente espèces sont reconnues, parmi lesquelles huit sont pathogènes dont trois ont une forte incidence économique à cause des dégâts qu'elles causent sur la production fruitière. *Monilinia fructicola* en Amérique, et *Monilinia laxa* en Europe sont responsables de la pourriture brune des fruits à noyaux. *Monilinia laxa* est aussi pathogène des fruits à pépins.

La première partie du livre est constituée de 4 chapitres portant essentiellement sur la biologie des espèces. Le premier chapitre donne une description sommaire des aires d'études, la technique d'obtention des fructifications des champignons à partir de matériels secs (feuilles, fruits, bourgeons, etc.), les milieux de culture pour isoler ana- et téleomorphes ainsi que les conditions de lumière et de température, les moyens d'obtenir des apothécies, la préparation

de l'inoculum, la sélection des parties de l'hôte sensibles à l'inoculation, l'évaluation de la pathogénicité sous conditions contrôlées. Le deuxième chapitre comporte une description minutieuse de la micromorphologie des structures et leur signification taxonomique. Une iconographie de bonne qualité accompagne ces descriptions. Les interactions entre l'hôte et l'environnement ainsi que les différents symptômes font partie du troisième chapitre. La séparation des espèces en deux groupes: *Junctoriae* et *Disjunctoriae* selon la spécificité des hôtes et le trophisme des espèces, apparaît comme très importante. Enfin les méthodes de contrôle incluant l'élimination des espèces endémiques, l'utilisation de fongicides, la lutte biologique (avec une partie intéressante sur le rôle des arthropodes dans le sol) jusqu'à la sélection de souches résistantes ou tolérantes à la contamination par *Monilinia* composent ce chapitre. L'étude de la dispersion des conidies de certaines espèces du groupe *Disjunctoriae* par les insectes constitue un bref quatrième chapitre. Les deux derniers, qui forment la deuxième partie du livre abordent la biosystématique des Sclerotiniaceae et du genre *Monilinia* en particulier (chapitre 5) et des espèces mal connues (et donc mal définies) ou proches du point de vue du parasitisme (chapitre 6). L'identification des espèces de *Monilinia* par les anamorphes en tenant compte de la présence ou absence des disjoncteurs entre les conidies, la forme et la taille de celles-ci ainsi que les caractéristiques des cultures sur milieu gélosé et la spécificité parasitaire sont pris en compte de façon intéressante et conduisent à une clef d'identification très précise portant sur 30 espèces.

Cet ouvrage contribue à une bonne appréhension des espèces, avec les nuances qu'apportent l'observation des 1300 individus collectés. D'autres méthodes d'étude, telles que le séquençage d'ADN, ou l'analyse du polymorphisme enzymatique pourraient corroborer (ou non) de façon intéressante la délimitation des espèces déjà bien définie par les méthodes biologiques utilisées par l'auteur. Ce livre sera certainement très bien venu pour les phytopathologistes et autres mycologues intéressés par la taxonomie et la biologie de ce groupe de champignons.

L. Bettucci

RAPILLY Frantz, 1991 - *L'épidémiologie en pathologie végétale. Mycoses aériennes*. Paris, INRA, 317p. ISBN 2-7380-0297-8, 250 F.

Comme l'indique le titre, cet ouvrage présente essentiellement, mais de façon exhaustive, les connaissances actuelles concernant l'épidémiologie des maladies cryptogamiques des organes aériens des plantes. L'ouvrage est divisé en trois parties, la première regroupant un chapitre de généralités (situation de l'épidémiologie dans le système phytosanitaire des productions végétales) et trois chapitres de rappel des notions de pathologie végétale nécessaires à la compréhension des phénomènes épidémiologiques: le cycle de base d'une maladie et les éléments physio-pathologiques de la population-hôte, l'impact épidémiologique des facteurs climatiques, enfin les états et les interactions génétiques qui, dans les populations co-adaptées d'hôtes et de pathogènes, régissent l'intensité du phénomène épidémique.

La seconde partie de l'ouvrage analyse pas à pas, en autant de chapitres, les diverses étapes du cycle de base d'une maladie: état de l'inoculum primaire, contamination, incubation et latence, sporulation et période contagieuse, dissémination et transport, captation et rétention des spores. Dans chacun de ces six chapitres, l'analyse détaillée de l'étape considérée conduit évidemment à préciser son rôle au niveau des étapes suivantes, donc son impact épidémiologique, et à en déduire les principales conséquences pratiques:

modalités d'intervention, possibilités de prévisions, contraintes expérimentales, axes à prospecter, etc.

La troisième partie, synthétique et plus théorique, présente d'abord, après définition des paramètres à appréhender (notations, relations entre les notations et les pertes), l'enchaînement des cycles de base et leur intégration qui constitue le phénomène épidémiologique, en tentant de préciser le rôle des éléments les plus déterminants de la vitesse de progression d'une maladie. Suit un chapitre consacré aux méthodologies: techniques statistiques, approche systémique, modélisations et simulations. Après un court chapitre relatif à l'épidémiologie comparée, discipline encore peu développée, l'ouvrage se termine par les perspectives qu'offre l'épidémiologie dans le cadre de la gestion sanitaire des cultures.

Avec de nombreuses figures et tableaux, l'ouvrage est bien présenté et de lecture assez facile malgré quelques phrases un peu sybillines comme, par exemple, p. 52 à propos de populations d'effectifs  $p + q = 1$ : "Des études détaillées ont montré que la pente... varie peu en fonction de  $p_0$  et  $q_0$  si les valeurs de  $p_1$  et  $q_1$  sont identiques mais varie beaucoup avec les variations de la valeurs totale  $p_0 + q_0$ ". Quel est le sens de "identiques" et que se passe-t-il puisqu'apparemment  $p_0 + q_0 = 1$ ? Il est à noter que l'auteur a tenu, au prix de quelques répétitions inévitables, à ce que chaque chapitre constitue un ensemble qui puisse être consulté indépendamment du reste de l'ouvrage; il a pleinement réussi, ce qui contribue notablement à l'aisance de la lecture.

On peut être un peu plus réservé sur l'intention apparemment délibérée de suivre au plus près les formulations originales dans les développements théoriques et les présentations de modèles. Ceci permet évidemment de s'y référer facilement, sans avoir à établir des equivalences de notations. Toutefois, dans un ouvrage de synthèse comme celui-ci, cette option présente l'inconvénient d'introduire une hétérogénéité qui peut troubler d'autres lecteurs. Pour donner un exemple simple, il est précisé parmi les sigles utilisés dans le modèle EPISEPT (p. 257) que  $\log$  désigne le logarithme décimal,  $\text{Log}$  le logarithme népérien. La même convention aurait pu être appliquée à l'ensemble de l'ouvrage dans lequel le logarithme népérien est parfois noté  $\text{Ln}$  (P. 151, 198,...), ou encore  $\text{L.e}$  (p. 69), voire  $\log e$  (p. 193, 230...), ou simplement  $\text{Log}$  (p. 156), encore que ce dernier symbole,  $\text{Log}$ , puisse désigner ailleurs le logarithme décimal (p. 142 où  $\text{Log } 2 = 0,301$ ).

Il faut aussi éviter de perpétuer un raisonnement biaisé, même s'il est communément admis. Par exemple, p. 209, le modèle de Krupp et Sterling exprime la force d'adhésion  $F$  d'une sphère à une surface lisse sous la forme  $F = \pi p^2 H + \pi p^2 P$ , c'est-à-dire par le produit de la surface de contact,  $\pi p^2$ , et de la somme de deux paramètres indépendants ayant la dimension de pressions:  $H$  (pression de résistance à la déformation) et  $P$  (cumul des pressions exercées par les forces de van der Waals et les forces électrostatiques). On peut indifféremment introduire une force  $F_0 = \pi p^2 H$  dans cette expression qui devient  $F = F_0 (1 + P/H)$  mais  $H$ , contenu dans  $F_0$ , figure alors, en réalité, à la fois dans le numérateur et dans le dénominateur du produit  $F_0 P/H = \pi p^2 P$ . Contrairement à l'affirmation de Krupp et Sterling, cette formulation n'autorise pas à en déduire une relation inverse entre  $F$  (force d'adhésion) et  $H$  (pression de résistance à la déformation). On ne se défie jamais assez des pièges de la bibliographie.

Toutefois, ce ne sont là que des remarques mineures par rapport aux mérites de cet ouvrage qui nous apporte une vue d'ensemble sur un domaine de

recherche encore jeune (l'épidémiologie des maladies des plantes n'existe véritablement que depuis les années 60) et qui évolue rapidement. On ne peut que le conseiller vivement, non seulement aux pathologistes mais aussi aux mycologues (l'épidémiologie est partie intégrante des processus de co-adaptation entre populations de plantes-hôtes et populations de champignons), aux écologistes (l'épidémiologie est à la base de nos espoirs de lutte biologique), aux gestionnaires des productions végétales (la connaissance des - et donc le recours aux - résistances des populations est moins onéreux que l'emploi de substances chimiques), et à tous les agronomes en général.

P. Joly

JENNINGS D.H. & BRAVERY A.F., 1991 - *Serpula lacrymans*. Fundamental Biology and Control Strategies. Chichester, J. Wiley, 217p., ISBN 0-471-93058-X.

Cet ouvrage est constitué de 13 chapitres indépendants portant sur un sujet bien spécifique de la Biologie de la Merule (*Serpula lacrymans*), champignon lignivore agent de pourriture cubique (Dry rot des anglo-saxons) sévissant dans les bâtiments. Ces chapitres ont été rédigés par les plus grands spécialistes actuels de la Mycologie et de la Preservation du Bois, non seulement d'Europe mais aussi du Japon, des Etats-Unis et d'Australie. Les différents thèmes sont abordés de manière très scientifique avec pour chacun une analyse bibliographique très complète et la référence à de nombreuses expériences de laboratoire et *in situ*.

Le premier chapitre traite de la taxonomie; longtemps appelé *Gyrophana lacrymans* ou *Merulius lacrymans*, la dénomination *Serpula lacrymans* doit être utilisée car elle est fondée sur la forme, la couleur et les dimensions des spores de ces espèces (D.H. Pegler).

L'ultrastructure des différents éléments des champignons (spores, mycélium, rhizomorphes, fructifications) est décrite avec précision ainsi que le mode de pénétration dans le bois, il est également expliqué comment à partir du mycélium sont formés, d'une part, les fameux cordonnets qui propagent le champignon et, d'autre part, les fructifications, autre source importante de dissémination de l'espèce (J. Nuss, D.H. Jennings, C.J. Veltkamp).

B. Hegarty décrit les différents facteurs pouvant affecter la formation des fructifications. On sait qu'une fructification de 100cm<sup>2</sup> produit 50 millions de spores en 10 minutes, la lumière et une certaine ventilation sont nécessaires, elles se développent par contre sur n'importe quel substrat, même non nutritif. Il reste encore de nombreux progrès à faire dans l'obtention des fructifications en laboratoire et dans la connaissance des facteurs influençant la germination des spores.

La physiologie et la biochimie du mycélium végétatif sont étudiées par D.H. Jennings. Les expériences ont été réalisées sur des substrats où apparait la Merule dans le bâtiment, le métabolisme des hydrates de carbone, la production d'acide oxalique, la nécessité de la présence d'azote sont étudiées.

De même sa sensibilité aux températures élevées est évoquée. C.R. Coggins, suite à de nombreuses observations dans le bâtiment, décrit des développements de Merule *in situ*. La croissance du mycélium sur les plâtres et maçonneries humides est largement évoquée. La Merule préfère les plâtres anciens dont le pH est devenu moins alcalin mais sa production d'acide oxalique entraîne une diminution du pH avec formation de cristaux d'oxalate de calcium,

le plâtre est alors détruit. Les conditions de développement sont évoquées; en particulier ce champignon peut se contenter de taux d'humidité très bas et le mycélium peut survivre des années ou même revivre après 8 ans dans du bois sec.

G.M. Bricknell, fait part de ses connaissances d'expert pour déceler la présence du champignon et l'étendue des dégâts; quelles sont les sources d'humidité dans les bâtiments, l'influence du type de construction, de son âge, des matériaux et également, les erreurs de conceptions ?

A.F. Bravery décrit les moyens curatifs actuels pour éliminer le champignon dans les ouvrages. Les mesures prioritaires consistent avant tout à localiser et supprimer l'humidité et sécher rapidement (ventilation). Viennent ensuite l'élimination du champignon et le traitement avec un fongicide adéquat nécessaire si la suppression de la source d'humidité est incertaine. Il s'avère nécessaire pour des raisons de protection de l'environnement d'adopter une stratégie de contrôle du développement de la Mèrulle.

O. Wächli décrit l'importance des développements de Mèrulle dans les différents cantons suisses et la nécessité des traitements curatifs, de même A. Pia Koch fait une analyse semblable pour le Danemark. Dans ce pays, la détection de la Mèrulle est faite par des chiens "Sniffer dog", ce qui permet une surveillance systématique des immeubles à risques.

Le traitement curatif des murs se fait par brûlage, sans nécessité de produits chimiques.

La Mèrulle sévit également en Australie, le problème soulevé est la différence entre une région et une autre et également du type de construction. Au Japon, S. Doi décrit les attaques fréquentes dans les maisons en bois tout particulièrement dans l'île d'Hokkaido humide. Aux Etats Unis c'est *Meruliporia incrassata* qui sévit tout particulièrement (H. Burdsall).

Enfin, le dernier chapitre est consacré à Richard Falck (1873-1955), mycologue, à l'origine d'immenses travaux de recherches sur la Mèrulle.

MOREAU C. (avec le concours de B. ROUARD), 1988 - Guide des champignons comestibles et vénéneux. Paris, Larousse, réimpression 1991, 264 p., nombreuses fig. et phot. col. ISBN 2-03-730203-7.

Dans son dernier tirage, ce guide a gardé toutes les qualités qu'on lui connaissait auparavant. En effet, sous un petit format très pratique et avec une présentation claire, sont réunies des notions générales sur les champignons, des descriptions concises des espèces, une illustration soignée composée de dessins finement réalisés et de photographies pour la plupart fidèles dans la reproduction des couleurs, enfin des indications sur les empoisonnements. A ce sujet, il aurait peut-être été souhaitable, pour attirer l'attention sur les champignons dangereux et, en particulier, mortels, de les marquer d'un signe plus voyant.

Malgré la valeur de cet ouvrage, on ne peut le recommander sans réserve car, l'Éditeur ne s'étant pas soucié des changements survenus en Mycologie depuis la publication du Larousse des Champignons, diverses informations seraient à revoir: adresse de la Société Mycologique de France, noms de genres (*Tremellodon*, *Clavariella*, *Pleurotus olearius*, *Volvaria*, *Psalliota*, etc.), nom français du *Cortinarius orellanus*... par exemple.

J. Perreau

ALESSIO C.L., 1991 - Supplemento a *Boletus* Dill. ex L. (*sensu lato*). *Fungi Europaei*. Italie, 21047 Saronno, Libreria editrice Biella Giovanna, 126 p., fig., 9 pl. col. (texte en italien).

Ce livre regroupe diverses notes, remarques, diagnostics et aquarelles destinées à compléter les descriptions des Bolets d'Europe données dans la première partie de l'étude sur le même sujet parue en 1985. En fin de volume est proposée une mise à jour bibliographique qui précise les références brièvement citées au fil du texte. L'illustration s'avère d'inégale valeur: si les dessins au trait - notamment de basidiospores avec un contour amiboïde - apparaissent peu démonstratifs, par contre les planches en couleurs sont magnifiques et d'une grande finesse de détails.

Comme le précédent, cet ouvrage offre une documentation de base sur les espèces traditionnellement reconnues, pour nos régions occidentales, dans le genre *Boletus* pris au sens large. En particulier, il reprend les descriptions de taxons spécifiques établis dans les dernières années, tels que *Xerocomus roseoalbidus*, *Boletus pseudoregius* et *Boletus depilatus* (d'ailleurs, on peut se demander pourquoi, p. 58, n° 39bis, cette combinaison, *B. depilatus*, créée par G. Redeuilh en 1985, est suivie de la mention *nov. sp.*). La portée du travail, se montrant en quelque sorte d'ordre historique, demeure limitée, car l'Auteur reste attaché à une conception ancienne aussi bien de la taxinomie que de la nomenclature et garde des appellations - *B. pinicola*, *B. albidus*, *B. purpureus*, *B. splendidus* par exemple - qui sont ambiguës ou recouvrent des ensembles de formes très variables. Il est vrai que les moyens habituels d'observation des champignons permettent de discerner la variabilité importante de certains groupements mais ne sont pas suffisants pour l'élaboration d'une systématique naturelle.

J. Perreau

o

o o

La Société Mycologique de France envisage la réédition de l'Atlas (textes et 250 planches en couleurs) publié dans son Bulletin depuis 1925.

Cette réédition serait faite sous forme de 2 tomes, à paraître annuellement, au prix prévisionnel de l'ordre de 300 F chacun.

Ce prix étant fonction du nombre d'exemplaires édités, les personnes intéressées sont priées de se faire connaître en écrivant au siège de la Société: 18 rue de l'Ermitage, 75020 Paris.





## INSTRUCTIONS AUX AUTEURS

**CRYPTOGAMIE**, Mycologie publie tous les travaux apportant une information fondamentale nouvelle, au plan de la systématique ou de la biologie des Champignons. La revue accepte les articles rédigés en français, anglais, allemand, espagnol et italien.

**TEXTE.** - Les manuscrits doivent être fournis en double exemplaire, dactylographiés à double interligne, sans rature ni surcharge, sans mots coupés et avec des marges de 4cm de chaque côté. Chaque manuscrit devra comporter:

- le titre de l'article, dans la langue du manuscrit, et sa traduction en anglais;
- le titre courant (haut-de-page) de 50 signes au maximum;
- les noms, prénoms et adresses des auteurs;
- deux résumés, l'un dans la langue du manuscrit, l'autre en français ou en anglais, d'environ 180 mots ou 15 lignes, faisant ressortir les résultats essentiels exposés dans l'article;
- des mots-clés qui seront sélectionnés par le Comité de Lecture;
- des légendes explicites des figures, planches et tableaux dans la langue du manuscrit et en anglais (ou français);

La présentation du texte devra faire apparaître clairement ses subdivisions et leur hiérarchie, ainsi que le début des paragraphes. Les notes infrapaginales seront numérotées et placées à la fin du texte.

**RÉFÉRENCES.** - La liste bibliographique devra se faire par ordre alphabétique des auteurs et chronologique par auteurs sans tenir compte des auteurs secondaires. Les titres des périodiques devront être abrégés suivant le B-P-H (Botanico-Periodicum-Huntianum, Pittsburg; Hunt Botanical Library, 1968), les ouvrages cités selon F.A. Stafleu & R.S. Cowan, 1976- ... Taxonomic literature. Ed. 2 Utrecht Antwerpen: Bohn, Scheltema & Holkema (*Regnum vegetabile* 94, 98, 105, 110...). Les références devront être présentées selon les modèles suivants:

PATOUILLARD N., 1881 - Sur l'appareil conidial de *Pleurotus ostreatus*. *Bull. Soc. Bot. France* 27: 125.

HEIM R., 1957 - *Les champignons d'Europe*. Paris, Boubée et Cie, 2: 571 p.

MANDELS G.P., 1965 - Kinetics of fungal growth. In : G.C. AINSWORTH & A.S. SUSSMAN, *The fungi*. N.Y. & London, Academic Press, 1: 599-612.

Les renvois à la liste bibliographique se feront par le nom de l'auteur et l'année de publication (utiliser "et al." lorsque l'article est signé par plus de deux auteurs) et non par les renvois numériques.

**ILLUSTRATIONS.** - Toutes les illustrations, y compris les tableaux, doivent être des originaux de qualité suffisante pour la reproduction directe en offset. Elles devront comporter les échelles (les grandissements x ... sont prohibés), les symboles nécessaires à leur compréhension, et être numérotées dans l'ordre d'appel dans le texte. Les tableaux devront être dactylographiés clairement, sans rature ni surcharge, en s'assurant de la qualité de la frappe. Les documents photographiques doivent être montés par planches. Les dimensions des originaux ne devront pas excéder le triple de celle de leur reproduction définitive (justification de la revue: 11,5 x 17,5cm) et les auteurs choisiront l'épaisseur des traits et la taille des caractères en fonction de la réduction éventuelle.

Pour diminuer les délais de parution, envoyez à la rédaction la version finale de votre article, enregistrée sur disquette au "format texte". Cette disquette devra être utilisable sous DOS (IBM) ou MacIntosh.

Tirages à part: limités à 150, dont 25 gratuits.

Conformément à la règle, les auteurs décrivant une espèce nouvelle doivent déposer le matériel type (échantillon sec ou culture) dans un herbier officiel: P.C. (Paris, Cryptogamie), CAB-IMI (Kew, Surrey) ou une collection de souches: L.C.P. (Lab. Cryptogamie, Paris), CAB-IMI, C.B.S. (Baarn, Hollande), etc.

## INSTRUCTIONS TO AUTHORS

**CRYPTOGAMIE**, Mycologie publishes the results of scientific research in systematics and biology of fungi. The journal accepts manuscripts written in French, English, German, Spanish, and Italian.

**TEXT.** - Two copies of the manuscripts, typed in double-spacing on one side paper with margins of 4cm, should be sent to the Redaction. Each typescript should include:

- the title, in the language of the manuscript, and its translation in English;
- the running title, of no more than 50 letters;
- the name and first name(s) of each author, and their complete address;
- two summaries, the first in the text language, the other in French or in English, of no more than 180 words or 15 lines, pointing out the main results of the paper;
- key words, chosen by the Review Committee;
- legends of text-figures, plates and tables should be self-explanatory, and listed together; written in the text language, and in English or in French.

The presentation of the text should point out very clearly its subdivisions and their hierarchy, as well as the beginning of each paragraph. The foot-notes should be numbered and collected at the end.

**REFERENCES.** - The references should be listed at the end of the text, arranged alphabetically and chronologically according to the first author. The titles of the journals should be abbreviated according to B-P-H (Botanico-Periodicum-Huntianum, Pittsburgh: Hunt Botanical Library, 1968), the books, cited according to F.A. Stafleu & R.S. Cowan, 1976- Taxonomic literature. Ed. 2. Utrecht Antwerpen: Bohn, Scheltema & Holkema. In the list of the references, the following outline should be adopted:

PATOUILLARD N., 1881 - Sur l'appareil conidial de *Pleurotus ostreatus*. *Bull. Soc. Bot. France* 27: 125.

HEIM R., 1957 - *Les champignons d'Europe*. Paris, Boubée et Cie, 2: 571 p.

MANDELS G.P., 1965 - Kinetics of fungal growth. In : G.C. AINSWORTH & A.S. SUSSMAN, *The fungi*. N.Y. & London, Academic Press, I: 599-612.

The corresponding references in the text should figure by the name of the author and the year of publication (use "et al.", for more than two authors). The numeric refer is prohibited.

**ILLUSTRATIONS.** - Each illustration, included tables, should be original ones, clearly drawn or typed, and of good quality, ready for direct reproduction by offset. They should include the scale bars, symbols necessary for their understanding, and they should be numbered consecutively, according to the order in the text. The photographs should be mounted on light carbocard, ready for reproduction. Originals should not be more than three times the size of the final reproduction (11.5x17.5cm). The authors should choose very carefully the corresponding thickness of lines, or characters size.

The publication of color plates is at the charge of the authors.

For shortening the delays of the publication, the author can send to the Redaction, the corrected version of his manuscript, on diskette in "text format". That diskette should be used under DOS (IBM) or MacIntosh.

Separata: not more than 150, of which 25 free copies.

Commission paritaire 16-1-1986 - N° 58611 - Dépôt légal 1<sup>er</sup> trimestre 1992 - Imprimerie F. Paillart  
Sortie des presses le 31 mars 1992 - Imprimé en France  
Éditeur : A.D.A.C. (Association des Amis des Cryptogames)  
Président : R. Baudoïn ; Secrétaire : D. Lamy  
Trésorier : J. Dupont ; Directeur de la publication : H. Causse



# CRYPTOGAMIE

## LE PÉRIODIQUE FRANÇAIS CONSACRÉ A LA CRYPTOLOGIE

CRYPTOGAMIE est un périodique édité par l'A.D.A.C. (Association des Amis des Cryptogames), dont le siège est au Laboratoire de Cryptogamie du Muséum National d'Histoire Naturelle. Les chercheurs de tous pays y publient leurs travaux en français, allemand, anglais, espagnol et italien, après accord des Comités de Lecture constitués de spécialistes de réputation internationale.

CRYPTOGAMIE propose trois sections:

- Cryptogamie, Algologie
- Cryptogamie, Mycologie
- Cryptogamie, Bryologie-Lichénologie

Chaque section publie 4 numéros par an (tirage: 450 exemplaires).

## THE FRENCH JOURNAL DEVOTED TO CRYPTOLOGY

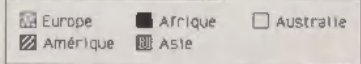
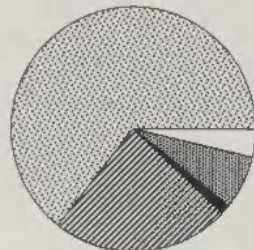
CRYPTOGAMIE is a periodical published by A.D.A.C. (Association des Amis des Cryptogames), settled at Laboratoire de Cryptogamie, Muséum National d'Histoire Naturelle. Research workers from the whole world publish their papers in French, German, English, Spanish and Italian, after acceptance by a selection committee that comprises experts of international renown.

CRYPTOGAMIE offers to its subscribers three sections:

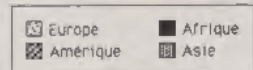
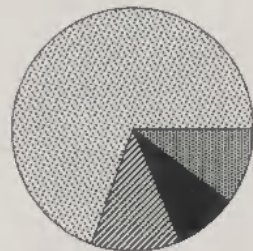
- Cryptogamie, Algologie
- Cryptogamie, Mycologie
- Cryptogamie, Bryologie-Lichénologie

Each section publishes 4 numbers a year (printing: 450 ex.).

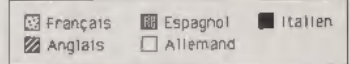
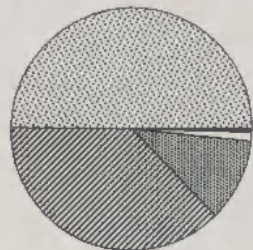
Diffusion de CRYPTOLOGIE



Origine des 453 articles publiés de 1986 à 1991



Répartition des articles publiés de 1986 à 1991 selon la langue



## SOMMAIRE

F. HINZELIN, F.H. JACOB, J. PERRIER et M.C. VERNER - Evolution de la flore levurienne au cours du traitement des ordures ménagères .....	1
L. BETTUCCI and S. SILVA - Interspecific interactions between wood-rotting fungi from old standing trees .....	11
Z. FORTAS et G. CHEVALIER - Caractéristiques de la germination des ascospores de <i>Terfezia arenaria</i> (Moris) Trappe, récolté en Algérie .....	21
A.I.I. ABDEL-HAFEZ and O.M.O. EI-MAGHRABY - Fungal flora and aflatoxin associated with cocoa, roasted coffee and tea powders in Egypt .....	31
G. DIAZ, A. ROLDAN y J. ALBALADEJO - Influencia del tipo de suelo sobre las pautas de colonización y eficiencia en la simbiosis micorrizica de seis especies de <i>Glomus</i> .....	47
L. ZUCCONI - Mycological exsiccata from Borneo, collected by Odoardo Beccari, kept in the Herbarium Cesarianum (RO) .....	57
C.V. SUBRAMANIAN - <i>Tretocephala decidua</i> gen. et sp. nov., an interesting new Hyphomycete .....	65
Analyses bibliographiques .....	69
Instructions aux auteurs .....	77